KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER

Bruxelles, den 29.10.2003
KOM(2003) 644 endelig

2003/0256 (COD)
2003/0257 (COD)

DEL I

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS FORORDNING

om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) {om persistente organiske miljøgifte}

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

(forelagt af Kommissionen)

{SEK(2003) 1171 endelig}

UDVIDET INDHOLDSFORTEGNELSE

DEL I

– Forslag til Europa-Parlamentet og Rådets forordning om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) {om persistente organiske miljøgifte}

– Forslag til Europa-Parlamentet og Rådets direktiv om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til "REACH-forordningen"

DEL II

Bilag I* Almindelige bestemmelser om vurdering af stoffer og udarbejdelse af kemiske sikkerhedsrapporter

Bilag II Undtagelser fra registreringspligten efter artikel 6, stk. 1, litra a)

Bilag III Undtagelser fra registreringspligten efter artikel 6, stk. 1, litra b)

Bilag IV Oplysningskrav omhandlet i artikel 9

Bilag V Obligatoriske standardoplysninger for stoffer, der fremstilles eller importeres i en mængde af 1 ton eller derover

Bilag VI Supplerende obligatoriske standardoplysninger for stoffer, der fremstilles eller importeres i en mængde af 10 tons eller derover

Bilag VII Supplerende obligatoriske standardoplysninger for stoffer, der fremstilles eller importeres i en mængde af 100 tons eller derover

Bilag VIII Supplerende obligatoriske standardoplysninger for stoffer, der fremstilles eller importeres i en mængde af 1000 tons eller derover

Bilag IX Almindelige regler for tilpasning af standardtestprogrammet beskrevet i bilag V til VIII

DEL III

Bilag X Testmetoder - A

DEL IV

Bilag X Testmetoder - B

DEL V

Bilag X Testmetoder - C

DEL VI

Bilag XI Almindelige bestemmelser om downstream-brugeres vurdering af kemiske stoffer og udarbejdelse af kemiske sikkerhedsrapporter

Bilag XII	Kriterier for identifikation af persistente, bioakkumulerbare og giftige stoffer, samt stoffer, der er meget langsomt nedbrydelige og i særlig grad ophobes i organismer
Bilag XIII	Fortegnelse over stoffer, der kræver godkendelse
Bilag XIV	Dokumentation
Bilag XV	Socio-økonomisk analyse
Bilag XVI	Begrænsninger i produktion, markedsføring og anvendelse af visse farlige stoffer, præparater og artikler
Bilag XVII	persistente organiske forurenende stoffer (”POPs”)

***** Alle bilag vedrører forslaget til forordning

FINANSIERINGSOVERSIGT TIL FORSLAGET

INDHOLDSFORTEGNELSE

UDVIDET INDHOLDSFORTEGNELSE 2

BEGRUNDELSE 6

Baggrunden for forslaget 6

Resultaterne af offentlige høringer og konsekvensanalyser 8

Forslagets juridiske elementer 11

Introduktion til forslaget 12

1. Årsager og mål 13

2. Forordningens indhold 20

3. Bilag 53

AFSNIT I GENERELLE SPØRGSMÅL 70

KAPITEL 1 INDHOLD OG ANVENDELSESOMRÅDE 70

KAPITEL 2 DEFINITIONER 71

AFSNIT II REGISTRERING AF STOFFER 74

KAPITEL 1 ANVENDELSESOMRÅDE 74

KAPITEL 2 GENEREL FORPLIGTELSE TIL AT FORETAGE REGISTRERING SAMT OPLYSNINGSKRAV 76

KAPITEL 3 REGISTRERING AF POLYMERER 84

KAPITEL 4 FORPLIGTELSE TIL AT FORETAGE REGISTRERING SAMT OPLYSNINGSKRAV FOR BESTEMTE TYPER AF ISOLEREDE MELLEMPRODUKTER 84

KAPITEL 5 FÆLLES BESTEMMELSER FOR ALLE REGISTRERINGER 86

KAPITEL 6 OVERGANGSBESTEMMELSER FOR INDFASNINGSSTOFFER OG ANMELDTE STOFFER ... 88

AFSNIT III DATADELING OG UNDGÅELSE AF UNØDVENDIGE FORSØG 89

KAPITEL 1 FORMÅL OG GENERELLE REGLER 89

KAPITEL 2 REGLER FOR IKKE-INDFASNINGSSTOFFER 90

KAPITEL 3 REGLER FOR INDFASNINGSSTOFFER 92

AFSNIT IV OPLYSNINGER I FORSYNINGSKÆDEN 94

AFSNIT V DOWNSTREAM-BRUGERE 98

AFSNIT VI VURDERING AF STOFFER 100

KAPITEL 1 ANVENDELSESOMRÅDE 100

KAPITEL 2 DOSSIER-VURDERING 100

KAPITEL 3 STOFVURDERING 102

KAPITEL 4 VURDERING AF MELLEMPRODUKTER 105

Kapitel 5 Fælles bestemmelser 105

AFSNIT VII GODKENDELSE 108

KAPITEL 1 GODKENDELSESKRAV 108

KAPITEL 2 TILDELING AF GODKENDELSER 113

KAPITEL 3 GODKENDELSER I FORSYNINGSKÆDEN 118

AFSNIT VIII BEGRÆNSNINGER FOR FREMSTILLING, MARKEDSFØRING OG ANVENDELSE AF VISSE FARLIGE STOFFER OG PRÆPARATER 118

KAPITEL 1 GENERELLE SPØRGSMÅL 118

KAPITEL 2 BEGRÆNSNINGSPROCESSEN 119

AFSNIT IX AGENTURET 122

AFSNIT X FORTEGNELSE OVER KLASSIFICERINGER OG ETIKETTERINGER 139

AFSNIT XI INFORMATION 141

AFSNIT XII KOMPETENTE MYNDIGHEDER 144

AFSNIT XIII HÅNDHÆVELSE 145

AFSNIT XIV OVERGANGSBESTEMMELSER OG

AFSLUTTENDE BESTEMMELSER 146

Forslag til EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier 151

BEGRUNDELSE

BAGGRUNDEN FOR FORSLAGET

Formålene med forslaget

I februar 2001 offentliggjorde Kommissionen en hvidbog om en strategi for en ny kemikaliepolitik (KOM(2001) 88 endelig), der var baseret på en gennemgang af det eksisterende EU-system til regulering af sikker brug af kemikalier. Kommissionen konkluderede, at det var nødvendigt at reformere den gældende lovgivning for at opfylde følgende mål:

– beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet

– opretholdelse og forbedring af EU's kemiske industris konkurrenceevne

– forhindring af en fragmentering af det indre marked

– øget gennemsigtighed

– tættere tilknytning til internationale bestræbelser

– fremme af forsøg uden dyr

– efterkommelse af EU's internationale forpligtelser under WTO.

Generel baggrund

Der er en række faktorer, der placerer den kemiske industri centralt i Fællesskabets strategi for en bæredygtig udvikling. Den spiller en vigtig økonomisk rolle som leverandør af materialer til fremstillingsindustrien, samt med hensyn til at stimulere innovation og med hensyn til at levere produkter, der er nødvendige for at opretholde og forbedre livskvaliteten. Den kemiske industri er også en vigtig bidragsyder til den økonomiske udvikling og Europas overskud på betalingsbalancen. Det at opretholde en konkurrencedygtig og innovativ kemisk industri i Europa er defor et vigtigt mål.

På det sociale niveau og arbejdsmarkedsniveauet er forbedringen af arbejdstagernes og borgernes sundhed et centralt politisk mål for Fællesskabets kemikaliepolitik. Opretholdelse af et højt beskæftigelsesniveau er også et centralt mål.

For så vidt angår miljøet, er det at undgå kemisk forurening af luft, vand, jord og bygninger, samt det at forhindre en forringelse af biodiversiteten også vigtige målsætninger. Forbedret styring af persistente, bioakkumulerende og toksiske stoffer er særlig vigtig i denne forbindelse.

Behovet for at fremme disse mål har fundet støtte på højeste politiske niveau. På det Europæiske Råd i Bruxelles den 20. og 21. marts 2003 blev det på den ene side understreget, at "konkurrenceevnen igen skal være i centrum", og at øgede erhvervsinvesteringer inden for FoU og innovation skulle fremmes På den anden side blev det fremhævet, at det er nødvendigt at lette presset på miljøet og bevare naturressourcerne inden for rammerne af den overordnede strategi for en bæredygtig udvikling, der blev lanceret i Göteborg, samt at

fremme en bæredygtig udvikling på verdensplan ved at opfølge de politiske mål, der blev fastsat i Johannesburg, bl.a. med hensyn til en sund forvaltning af kemikalier.

Gældende kemikalielovgivning

I det nuværende system for generelle industrikemikalier skelnes der mellem "eksisterende stoffer", dvs. alle kemikalier, der var anmeldt som værende på markedet i september 1981, og "nye stoffer", dvs. stoffer, som er markedsført efter denne dato.

Der findes omkring 3 000 nye stoffer. I henhold til direktiv 67/548/EØF kræves der inden markedsføring af nye stoffer i mængder på 10 kg eller derover en prøvning og vurdering af den risiko, de indebærer for mennesker og miljø. Ved større mængder skal der forelægges grundigere prøvninger, der fokuserer på langtidsvirkninger og kroniske virkninger.

Eksisterende stoffer udgør mere end 99% af den samlede mængde af alle stoffer, der er på markedet, og er ikke underkastet samme krav med hensyn til prøvninger. I 1981 blev der anmeldt 100 106 eksisterende stoffer, og i dag anslås antallet af stoffer, som der markedsføres 1 ton eller mere af, til 30 000. Omkring 140 af disse stoffer er udpeget som prioriterede stoffer, og medlemsstaternes myndigheder er i gang med en fuldstændig risikovurdering af dem i henhold til forordning (EØF) nr. 793/93.

Der er generel mangel på offentligt tilgængelig viden om eksisterende stoffers egenskaber og anvendelser. Risikovurderingen er en langsommelig og ressourcekrævende proces, hvilket forhindrer, at systemet fungerer effektivt. Ansvarsfordelingen er uhensigtsmæssig, idet det er de offentlige myndigheder, der er ansvarlige for vurderingen, og ikke de virksomheder, der fremstiller, importerer eller anvender stofferne. Endvidere kræver gældende lovgivning kun, at producenter og importører skal indgive oplysninger, mens de såkaldte downstream-brugere (industribrugere og formuleringsvirksomheder) ikke pålægges lignende forpligtelser. Derfor er det vanskeligt at fremskaffe oplysninger om stoffernes anvendelser, og der findes i reglen kun sparsomme oplysninger om eksponering som følge af downstream-brugen. Der kan kun via en langvarig udvalgsprocedure træffes beslutning om yderligere prøvninger af stoffer, og dette kan først kræves af industrien, når myndighederne har bevist, at et stof kan indebære en alvorlig risiko. Uden prøvningsresultater er det imidlertid så godt som umuligt at føre et sådant bevis. Derfor er der kun gennemført en endelig risikovurdering af ganske få stoffer.

I henhold til direktiv 76/769/EØF, der begrænser markedsføring og anvendelse af visse farlige stoffer og præparater har Kommissionen forpligtet sig til at gennemføre risikovurderinger og udførlige cost/benefit-analyser, inden den vedtager eller fremsætter forslag til lovgivning, der berører den kemiske industri. Så snart noget tyder på uacceptable risici (typisk som følge af indberetning af nationale restriktioner), udarbejdes der rapporter, som behandles i Kommissionens Videnskabelige Komité for Toksicitet, Økotoksicitet og Miljø (CSTEE).

De eksisterende erstatningsansvarsordninger er utilstrækkelige til at afhjælpe de problemer, der er konstateret ved Kommissionens gennemgang. Erstatningsansvar bygger i reglen på det princip, at den, der forårsager skade, skal betale erstatning for denne skade. Dog forudsætter tilkendelse af erstatning normalt, at der kan bevises at være en kausal sammenhæng mellem årsagen og den forvoldte skade. Det er ofte en nærmest umulig opgave for den skadelidte, hvis der er stor tidsmæssig afstand mellem årsag og virkning, og hvis der ikke foreligger tilstrækkelige prøvningsdata om stoffets virkninger. Selv hvis der kan fastslås en årsagssammenhæng, er de erstatninger, som domstolene i EU-medlemsstaterne tilkender, generelt ikke så høje som i f.eks. USA og derfor af begrænset forebyggende virkning.

Sammenhæng med andre politikker

Kemikaliepolitikken har forbindelsesflader med en lang række andre områder. Ved udarbejdelsen af dens forslag har Kommissionen forsøgt at undgå at gentage bestemmelser i anden lovgivning, samtidig med at undgå, at der ikke skabes smuthuller, og den har forsøgt at sikre, at de nødvendige oplysninger stilles til rådighed for andre sektorer.

RESULTATERNE AF OFFENTLIGE HØRINGER OG KONSEKVENSANALYSER

Offentlige høringer

Efter offentliggørelsen af hvidbogen var der bred enighed om behovet for en reform. Både Ministerrådet og Parlamentet går klart ind for etablering af mere effektive ordninger og procedurer, som pålægger industrien større ansvar for at tilgængeliggøre oplysninger om farer, risici og risikobegrænsende foranstaltninger for de i øjeblikket anvendte kemikalier, og som vil skabe større tillid til, at farlige stoffer anvendes på en sikker måde. Industrien hilste den nye politiske retning, hvor virksomhederne selv skulle have mere ansvar for en sikker anvendelse af deres kemikalier, velkommen. Samtidig var den dog bekymret over konsekvenserne for konkurrenceevnen. Miljø-ngo'er og forbrugerorganisationer bakkede kraftig op omkring det synspunkt, at der var brug for en ny politik.

Internet-høring

I maj 2003 besluttede Kommissionen at gennemføre en Internet-høring for at vurdere, om udkastet til lovgivning, herunder de tekniske krav, var praktisk gennemførlig, uden at der blev sat spørgsmålstegn ved der foreslåede systems omfang og målsætninger. Høringen fandt sted mellem 15. maj og 10. juli 2003. Deltagerne kunne indsende deres svar på forskellige måder: i form af et online-spørgeskema, eller via e-post, fax eller pr. post ved anvendelse af en standardformular eller i fritekst. Alle bidrag blev offentliggjort på Internet; hvis deltagerne ønskede at være anonyme, blev deres navne ikke offentliggjort.

Der blev modtaget over 6 000 bidrag. 42% af disse kom fra industrien - virksomheder eller sammenslutninger. 142 ngo'er, herunder fagforeninger, deltog.

Fire af medlemsstaterne regeringer indsendte kommentarer (A, IRL, F, NL, UK), og en række offentlige myndigheder bidrog også (A, B, D, DK, FIN, GR, I, NL, S, UK). Offentlige myndigheder fra tre tiltrædelseslande (LAT, LIT, PL) samt myndigheder og regeringer i tredjelande (Australien, Canada, Chile, Kina, Israel, Japan, Malaysia, Mexico, Norge, Singapore, Schweiz, Thailand og USA) bidrog også med input. Internationale organisationer - det økonomiske samarbejde Asien-Stillehavsområdet (APEC) og Organisationen for økonomisk samarbejde og udvikling (OECD) - indsendte bemærkninger.

Ca. halvdelen af bidragene kom fra enkeltpersoner. Mange drejede sig om problemer i forbindelse med dyreforsøg, andre gav udtryk for frygt for tab af arbejdspladser eller krævede bedre beskyttelse af miljøet og menneskers sundhed samt bedre forbrugeroplysninger. Desuden blev der indsendt to underskriftsindsamlinger, støttet af 34 000 enkeltpersoner og organisationer.

De vigtigste problemstillinger og deres behandling

Systemets dækningsområde: medtagelsen af polymerer og stoffer i artikler i ordningen blev kritiseret af EU's industri og udenlandske handelspartnere som værende overdreven og

vanskelig at gennemføre. Kravet om at alle producenter, importører og downstream-brugere skulle foretage en kemisk sikkerhedsvurdering blev også kritiseret, fordi det går videre end hvidbogens forslag.

– Polymerer er blevet undtaget fra registrering og vurdering, men kan stadig være underlagt godkendelse og begrænsninger. Dette vil eventuelt blive ændret af Kommissionen, når der er udarbejdet solide videnskabelige kriterier til fastlæggelse af, hvilke polymerer, der eventuelt skal registreres.

– Stoffer i artikler behandles lempeligere.

– Kravet om gennemførelse af kemiske sikkerhedsvurderinger er blevet begrænset betydeligt.

Retssikkerhed: Industrien frygtede, at diligenspligten ville kunne udsætte den for ubegrænsede erstatningskrav. Den udtrykte også bekymring med hensyn til manglende appelmuligheder i agenturet.

– Diligenspligten er blevet erstattet af en forklaring af de principper, der ligger til grund for forordningen.

– Der indgår nu et appeludvalg i agenturet.

Omkostninger: industrien, nogle af medlemsstaterne og mange udenlandske handelspartnere gav udtryk for bekymring med hensyn til for høje omkostninger, især for kemikalier i mindre mængder, for downstream-brugere og for små og mellemstore virksomheder (SMV'er).

– For downstream-brugerne er kravet om at foretage kemiske sikkerhedsvurderinger og udarbejde kemiske sikkerhedsrapporter blevet begrænset betydeligt.

– Registreringsforpligtelserne blev forenklet for 1-10 tons (det er ikke nødvendigt at indsende kemiske sikkerhedsrapporter; kravene til forsøg er blevet indskrænket).

– Polymerer (se ovenfor).

– Der er blevet slækket på kravene om stram kontrol af transporterede mellemprodukter.

Bureaukrati/agenturets beføjelser: mange interessenter kritiserede generelt REACH for at være for buraukraktisk, og for at fordelingen af arbejdsopgaver (mellem medlemsstaterne og agenturet) var for kompliceret. De udtrykte også bekymring for, at der ikke ville være en harmoniseret fremgangsmåde i beslutningstagningen.

– Strømlinet registrering: alene agenturet vil være ansvarligt herfor.

– Vurdering: agenturet vil få et større ansvar for at systemet fungerer gnidningsløst og for at overvåge beslutningstagningen. Procedurerne er blevet omstruktureret og gjort klarere.

– Systemet med kemiske sikkerhedsrapporter er blevet bedre koordineret med det allerede eksisterende system med sikkerhedsdatablade.

– Agenturet har nu større beføjelser med hensyn til afgørelser om datadeling, undtagelser i forbindelse med forskning og udvikling (FoU) samt fortrolig behandling af data.

Fortrolighed og ret til oplysninger om kemikalier: industrien, og især downstream-brugerne, har givet udtryk for bekymring for, at de bliver nødt til at afsløre forretningshemmeligheder. Ngo'erne har argumenteret for en høje grad af gennemsigtighed med hensyn til den kemiske sammensætning af artikler.

– Bedre beskyttelse af fortrolige virksomhedsoplysninger: nogle typer af oplysninger vil altid blive behandlet som fortrolige, som f.eks. nøjagtig tonnage, kundenavne osv. Virksomhederne har også mulighed for at kræve fortrolig behandling, hvis der gives særlige grunde herfor, og hvis disse accepteres.

– Alle oplysninger, der ikke er fortrolige, vil kunne stilles til rådighed efter anmodning (EF-forordningen om aktindsigt), nogle oplysninger offentliggøres og er frit tilgængelige.

Substitution: Ngo'er, nogle industrisektorer og nogle medlemsstater har opfordret til strammere bestemmelser vedrørende substitution.

– Der vil være en tydeligere henvisning til substitution i betragtningerne og i bestemmelserne vedrørende godkendelse. Virksomhederne vil blive tilskyndet til at forelægge planer for substitution, som vil påvirke afgørelsen om godkendelse.

Dyreforsøg: en begrænsning af dyreforsøg har været et af de grundlæggende principper ved udformningen af forslaget. Kommissionens Videnskabelige Komité for Toksicitet, Økotoksicitet og Miljø (CSTEE) gav udtryk for bekymring for, at de forudsete dyreforsøg ikke ville give tilstrækkelige oplysninger til at undgå risici, og anførte, at det ville være nødvendigt med flere forsøg.

– Som følge af et stort offentligt pres for at begrænse dyreforsøg, er antallet af forsøg ikke blevet øget.

– For yderligere at reducere behovet for dyreforsøg, uden at dette går ud over menneskers sundhed eller miljøet, tilskyndes til brug af modeller for kvantitative eller kvalitative struktur-aktivitet relationer, QSAR'er. Det gøres også klart i teksten, at datadeling vil være obligatorisk.

Konsekvensanalyser

Der blev desuden iværksat særlige undersøgelser, navnlig vedrørende de forventede virkninger af det foreslåede system. Der tages hensyn til resultaterne heraf ved udarbejdelsen af konsekvensanalysen. Efterhånden som forslaget udvikler sig, vil der blive holdt øje med dets virkninger og foretaget opfølgninger. Interessenter vil blive inddraget i dette arbejde.

For så vidt angår de administrative aspekter, blev det i hvidbogen anført, at administrationen af det nye system ville kræve, at der blev oprettet en "central enhed", som skulle spille en central rolle i administrationen af REACH. Det mest hensigtsmæssige format for denne "enhed" blev dengang anset for at være Det Europæiske Kemikaliekontor, der er en del af Det Fælles Forskningscenter i Ispra, som i givet fald skulle udvides for at klare de ekstra arbejdsopgaver. Senere undersøgelser har rejst alvorlig tvivl om, hvorvidt en udvidelse af Kemikaliekontoret ville være den mest effektive struktur til at opfylde det nye systems

betydeligt større krav. Kommissionen gennemførte derfor en feasibility-undersøgelse. Efter en grundig gennemgang af alle elementer konkluderede Kommissionen, at oprettelsen af et agentur vil være af afgørende betydning for en effektiv gennemførelse af det foreslåede REACH-system. Derfor indeholder forslaget bestemmelser om et nyt agentur. Effektivitetshensyn, kontinuitet og optimal udnyttelse af ekspertise peger på Ispra som det bedst egnede sted til placering af agenturet.

Indsamling og brug af ekspertise

Efter offentliggørelsen af hvidbogen foretog Kommissionen en bred høring af eksperter. Dette skete i form af konferencer og arbejdsgrupper bestående af interessenter samt i form af bilateral kontakter mellem tjenestegrenene og interessenterne. I denne forbindelse bemærkes især de otte tekniske arbejdsgrupper, der blev indkaldt af Kommissionen i 2001-2002. Høring af relevante eksperter fandt også sted gennem hele udarbejdelsesprocessen.

FORSLAGETS JURIDISKE ELEMENTER

Retsgrundlag

EF-traktatens artikel 95 er det rette retsgrundlag som følge af nødvendigheden af at sikre ensartede spilleregler for alle økonomiske aktører i det indre marked, samtidig med at man sikrer en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet.

Valget af dette retsgrundlag sikrer, at kravene til stoffer harmoniseres, og at stoffer, der opfylder kravene, kan bevæge sig frit i det indre marked. Dette belønner de bestræbelser, som kræves af de økonomiske aktører for at opretholde det beskyttelsesniveau, som denne forordning kræver. Da stoffer desuden, alene eller i præparater eller i artikler, er varer, der bevæger sig i det indre marked, er det vigtigt, at de kan gøre dette under harmoniserede krav.

I henhold til artikel 95, stk. 3, kræves det, at der tilstræbes et højt beskyttelsesniveau i forslag vedrørende sundhed, sikkerhed, miljøbeskyttelse og forbrugerbeskyttelse. REACH-forordningen falder ind under dette område. Derfor kompromitterer anvendelsen af dette retsgrundlag ikke beskyttelsesniveauet.

Nærhedsprincippet og proportionalitetsprincippet

Nærhedsprincippet

Når man skal tilgodese nærhedsprincippet i den i EF-traktatens artikel 5 anvendte forstand, må det tages i betragtning, at den nuværende kemikalielovgivning allerede giver mulighed for udstrakt kontrol med klassificering, etikettering, markedsføring og anvendelse af stoffer og præparater. Den nye forordning vil i vidt omfang erstatte flere nuværende retsakter og udvide lovgivningen til områder, der hidtil har været utilstrækkeligt dækket. Spørgsmålet om nærhedsprincippet vedrører derfor kun denne udvidelse.

Da kemikalier handles på tværs af grænserne og for manges vedkommende kan medføre grænseoverskridende forurening, kan medlemsstaterne ikke selv i tilstrækkelig grad opnå, hvad der er forslagets formål. Fællesskabsdækkende lovgivning er derfor hensigtsmæssig. Det skal i denne forbindelse nævnes, at det i udtalelser fra både Rådet og Europa-Parlamentet påpeges, at en stærk EU-lovgivning er nødvendig for at få et højt niveau af sundheds- og miljøbeskyttelse samtidig med, at der sikres lige muligheder for alle økonomiske aktører i det indre marked.

Proportionalitetsprincippet

Et vigtigt punkt i den nye lovgivning for så vidt angår proportionalitetsprincippet (forslagets artikel 1, stk. 3) er, at ansvaret for sikker styring af risici i forbindelse med kemiske stoffer lægges over på industrien. Derved får industrien mulighed for at anvende risikobegrænsende foranstaltninger fra et tidligt tidspunkt i stoffets livscyklus og således undgå negative virkninger på downstream-brugere og kunder. Desuden giver det medlemsstaternes kompetente myndigheder mulighed for i højere grad at rette ressourcerne mod kvalitetsvurdering af oplysningerne fra industrien fremfor selv at skulle foretage risikovurderingen.

Den nye lovgivning dækker alle kemiske stoffer, der kan føre til en vis eksponering af borgere eller miljø, men der er gjort meget for at sikre, at den ikke bliver for vidtgående med hensyn til anvendelsesområde, omkostninger og administrative byrder. Derfor indeholder den nye lovgivning bestemmelser om en niveaudelt fremgangsmåde for visse klasser af kemiske stoffer. Dette gælder især stoffer, der kun anvendes i lav tonnage eller til særlige formål (f.eks. forskning og udvikling).

Til gavn for SMV'er betyder den niveaudelte fremgangsmåde samtidig, at systemet bliver mindre tungt med hensyn til omkostninger og administration, uden at beskyttelsen af sundheden og miljøet derved forringes.

Valg af retsakt

Anvendelsen af en forordning (som erstatter ca. 40 eksisterende direktiver) er berettiget, da den finder direkte anvendelse i hele Fællesskabet. Denne teknik har vid udbredelse inden for teknisk lovgivning og har allerede fået tilslutning fra medlemsstaterne på andre af Fællesskabets kompetenceområder[1]. Berettigelsen heraf er endnu større på baggrund af et udvidet Fællesskab med snart 25 medlemsstater, som med sikkerhed vil få gavn af ensartede og direkte gældende regler i hele Fællesskabet.

INTRODUKTION TIL FORSLAGET

Med forslaget etableres REACH-systemet, og der oprettes et Europæisk Kemikalieagentur. Kort fortalt omfatter REACH følgende elementer:

– En registrering, hvor industrien skal indhente relevante oplysninger om dens stoffer og bruge disse data til at håndtere dem sikkert.

– En vurdering, der skaber tillid til, at industrien opfylder sine forpligtelser og forhindrer unødige forsøg.

– De risici, der er forbundet med brug af stoffer med meget problematiske egenskaber, vil blive undersøgt, og hvis de styres tilfredsstillende, eller hvis de samfundsøkonomiske fordele opvejer risiciene, og der ikke findes passende alternative substitutionsstoffer eller -teknologier, vil der blive givet godkendelse til de pågældende anvendelser.

---

[1] Se den nye forordning (EF) nr. 178/2002 om fødevarelovgivningen samt Kommissionens nylige forslag til forordninger om gødninger (KOM(2001) 508), vaske- og rengøringsmidler (KOM(2002) 485) og narkotikaprækursorer (KOM(2002) 494).

– Begrænsningsproceduren giver et sikkerhedsnet med hensyn til at styre risici, der ikke i tilstrækkelig grad er omfattet af de andre dele af REACH-systemet.

Agenturet skal styre de tekniske, videnskabelige og administrative aspekter af REACH-systemet på fællesskabsniveau med det mål at sikre, at REACH-systemet fungerer godt, og at interessenterne har tillid til det.

1. ÅRSAGER OG MÅL

1.1. Generelle spørgsmål: formål, anvendelsesområde og definitioner

Her gennemgås REACH-systemets dækningsområde, og de termer, der anvendes i forordningen, defineres. Desuden forklares de principper, som forordningen er baseret på.

1.2. Registrering

Der er en generel forpligtelse til at registrere stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på 1 ton eller derover. Hvis der ikke foretages en registrering, må stoffet ikke fremstilles eller importeres.

Bestemmelserne vedrørende registrering forpligter producenter og importører af stoffer til at tilvejebringe viden om de stoffer, som de fremstiller eller importerer, om nødvendigt gennem forsøg, og til at anvende denne viden til at sikre en ansvarlig styring af de risici, som stofferne kan indebære, på et solidt videngrundlag.

Producenter og importører skal behandle risiciene i forbindelse med enhver anvendelse, som deres downstream-brugere har identificeret over for dem. En downstream-bruger har ret til at identificere en anvendelse, og i et sådant tilfælde er den pågældende ansvarlig for at foretage en kemisk sikkerhedsvurdering. På den anden side er en producent ikke forpligtet til at levere et stof til en anvendelse, som han ikke synes, at han kan støtte. Med henblik på håndhævelse og for at opnå gennemskuelighed skal registreringsoplysningerne indsendes til myndighederne.

Forordningen indeholder dispensationer for visse stoffer, der er tilstrækkeligt regulerede under anden lovgivning, eller generelt indebærer så ringe risiko, at registrering ikke er påkrævet. Registrering kræver indsendelse af et teknisk dossier med oplysninger om stoffet og risikostyringsforanstaltninger samt - fra 10 tons og derover - den kemiske sikkerhedsrapport, der dokumenterer valget af disse foranstaltninger. Hvilke oplysninger, der kræves, afhænger af mængden i tons, idet denne giver en indikation for potentiel eksponering. Der indgår også bestemmelser vedrørende generering af oplysninger, som skal sikre, at kvaliteten af oplysningerne er acceptabel. For at reducere omkostningerne for industrien og myndighederne er der indført bestemmelser om fælles indsendelse af data.

Med hensyn til registrering af stoffer i artikler gælder en særlig ordning: af hensyn til proportionaliteten og under hensyntagen til på den ene side de mange millioner artikler, der markedsføres i EU, og på den anden side den potentielle risiko for at skade menneskers sundhed og miljøet, som nogle af disse indebærer, skal visse stoffer, der er inkorporeret i artikler, registreres. Dette er påkrævet, når det pågældende stof har farlige egenskaber, og det er hensigten, at det skal frigives fra artiklen. For stoffer, der frigives i forbindelse med artiklens anvendelse, er det blot nødvendigt at foretage en simpel indberetning, på grundlag af hvilken en myndighed kan kræve en registrering. Mængdegrænserne er som for ethvert stof, der fremstilles i eller importeres til EU, og gælder pr. artikeltype.

Disse krav til visse stoffer i artikler er nødvendige som følge af deres potentielle indvirkning på menneskers sundhed og miljøet. Det skal bemærkes, at der ikke af importørerne kræves en indholdsdeklaration for indholdet i artikler. Med bestemmelserne pålægges importører og EU-producenter af artikler de samme forpligtelser.

Myndighedernes håndhævelse af disse bestemmelser forventes først og fremmest at fokusere på tilfælde, hvor det godtgøres, at et stof, der frigives fra artikler, er til skade for menneskers sundhed eller miljøet. Agenturet skal udarbejde vejledninger i anvendelsen af disse bestemmelser til støtte for producenter og importører af artikler samt de kompetente myndigheder.

Polymerer er undtaget fra kravet om registrering. Kommissionen kan lade visse polymerer være omfattet af kravet om registrering efter en rapport om de risici, som polymererne indebærer i sammenligning med andre stoffer, og det eventuelle behov for at registrere visse typer af polymerer under hensyntagen til dels konkurrenceevne og innovation og dels til beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet. For visse isolerede mellemprodukter kræves der kun en begrænset form for registrering. Der skelnes mellem mellemprodukter, der ikke forlader anvendelsesstedet, og mellemprodukter, der transporteres mellem steder under kontrollerede betingelser. I sidstnævnte tilfælde kræves der flere oplysninger, hvis den transporterede mængde er på over 1 000 tons, fordi risikoen for eksponering potentielt er lidt højere.

Der er en række fælles bestemmelser for alle registreringer, herunder den procedure, som agenturet skal følge ved behandlingen af registreringerne. I betragtning af, at der forventes tusindvis af registreringer, vil der blive foretaget en enkel fuldstændighedskontrol. Hvis registrering ikke afvises inden for en fastsat frist, kan industrien begynde eller fortsætte med at fremstille eller importere det pågældende stof.

For at lette overgangen til REACH-systemet, er der bestemmelser for indfasning af registreringskravne for stoffer, der allerede findes på fællesskabsmarkedet. Endelig anses anmeldelser i henhold til direktiv 67/548/EØF for at være registreringer, idet sådanne anmeldelser giver et tilsvarende informationsniveau.

1.3. Datadeling og undgåelse af unødvendige dyreforsøg

Der er indført en række regler vedrørende fælles brug af data for at reducere antallet af forsøg med hvirveldyr og reducere industriens omkostninger. Relevante data skal mod betaling deles med andre. For indfasningsstoffer etableres et system, der skal hjælpe registranter med at finde frem til andre registranter, som de kan dele data med. De skal derefter dele data.

1.4. Oplysninger i forsyningskæden

Bestemmelserne vedrørende information gennem forsyningskæden sikrer, at alle brugere af stoffer råder over de oplysninger, der er nødvendige for en sikker anvendelse I henhold til bestemmelserne skal oplysninger leveres i begge retninger i forsyningskæden og mellem alle aktører i kæden. Det vigtigste værktøj til overførsel af oplysninger er det sikkerhedsdatablad, der er omhandlet i bilag Ia. REACH-forordningen erstatter det nuværende direktiv om sikkerhedsdatablade (91/155/EØF).

1.5. Downstream-brugere

Disse bestemmelser forpligter downstream-brugerne til at overveje sikkerheden i forbindelse med deres anvendelse af stoffer, først og fremmest på grundlag af oplysninger fra deres leverandør, og træffe passende foranstaltninger til risikostyring. De giver også myndighederne mulighed for at få et overblik over anvendelsesområderne for et stof i dets færd gennem forsyningskæden, og myndighederne kan så, hvis det er nødvendigt, anmode om yderligere oplysninger og træffe passende foranstaltninger.

Til en bestemt, identificeret anvendelse kan downstream-brugeren bruge de risikostyrings-foranstaltninger, der er udarbejdet af producenten eller importøren, men han skal sikre sig, at de relevante eksponeringsscenarier er konsistente med hans anvendelse, og at han har gennemført alle relevante risikostyringsforanstaltninger. Der skal udvikles retningslinjer for at sikre, at denne proces bliver overkommelig, især for små og mellemstore virksomheder.

Hvis en downstream-bruger anvender et stof på en måde, som ikke er omfattet af producentens eller importørens kemiske sikkerhedsvurdering (herunder inkorporering i en artikel), eller hvis han har til hensigt at anvende andre risikostyringsforanstaltninger, skal han indsende en kortfattet rapport til agenturet. Dette sætter myndighederne i stand til at føre kontrol med uidentificerede anvendelser, og vil eventuelt medføre, at de foretager en vurdering af stoffer med utilsigtede anvendelsesområder, der kan være problematiske.

Downstream-brugere skal ikke fremsende kemiske sikkerhedsvurderinger til myndighederne, idet den administrative byrde for både industrien og myndighederne ville blive uforholdsmæssig stor. Desuden ville dette medføre en forpligtelse for downstream-brugerne til også at indsende alle opdaterede sikkerhedsvurderinger.

1.6. Vurdering

Der findes to typer vurderinger:

- dossier-vurderinger, som igen er opdelt i to:
  - Et mål er at forhindre unødvendige dyreforsøg. Forordningen kræver derfor, at myndighederne gennemgår forslag til forsøg for at kontrollere kvaliteten, før et forsøg gennemføres, og for at forhindre, at det samme dyreforsøg gennemføres flere gange.
  - Desuden pålægger forordningen myndighederne at kontrollere, at registreringsdossierne er i overensstemmelse med kravene i afsnittet om registreringer.
- Stofvurdering: giver myndighederne en mekanisme til at kræve, at industrien indhenter og fremsender yderligere oplysninger, hvis der er mistanke om risici for menneskers sundhed eller miljøet.

For at fremme en konsekvent fremgangsmåde vil agenturet udvikle retningslinjer for prioritering af stoffer til vurdering. Medlemsstaterne udarbejder derefter rullende planer for stoffer, som de ønsker at vurdere. Der findes en procedure til afgørelse af uenigheder med hensyn til, hvilken medlemsstat, der bør vurdere et givet stof.

Når et udkast til afgørelse udarbejdet af en kompetent myndighed i en medlemsstat kræver yderligere oplysninger om et stof, skal dette accepteres af andre kompetente myndigheder i medlemsstaterne gennem en skriftlig procedure. Agenturet får ansvaret for at sikre konsekvensen i sådanne afgørelser på udkasttrinnet, og det træffer disse afgørelser, når medlemsstaterne er nået til enighed.

En vurdering kan medføre, at myndighederne konkluderer, at der skal interveneres i henhold til begrænsnings- eller godkendelsesprocedurerne i REACH, eller at der skal videregives oplysninger til andre myndigheder med ansvar for relevant lovgivning. Et fælles træk ved disse reguleringsmæssige aktiviteter er, at de er afhængige af gode data. Vurderingsprocessen vil sikre sådanne data, og de vil af agenturet blive stillet til rådighed for de relevante organer.

1.7. Godkendelse

Der etableres en godkendelsessystem for anvendelser af stoffer og markedsføring af stoffer til sådanne anvendelser for så vidt angår meget problematiske stoffer. De stoffer, der er udvalgt til godkendelsessystemet har farlige egenskaber, der er så problematiske, at det er vigtigt at regulere dem via en mekanisme, der sikrer, at risiciene i forbindelse med deres anvendelse vurderes og vægtes, og at Fællesskabet træffer afgørelse om dem, før de anvendes. Dette er berettiget fordi virkningerne af CMR-stoffer i kategori 1 og 2 på mennesker normalt er så alvorlige og normalt er irreversible, og sådanne virkninger bør derfor forhindres i stedet for udbedres, og fordi PBT-stoffer/vPvB-stoffer akkumuleres i levende organismer, således at der allerede ville have fundet en irreversibel akkumulering sted, hvis der først efterfølgende blev grebet ind med regler. Det samme gælder for andre stoffer, der er tilsvarende problematiske, og for hvilke der kan kræves godkendelse fra sag til sag.

I overensstemmelse med den generelle fremgangsmåde i REACH er kravene til ansøgerne i godkendelsesprocessen risikobaseret, idet de skal påvise, at risiciene i forbindelse med anvendelsen af det pågældende stof er under tilfredsstillende kontrol, eller at de mere end opvejes af de samfundsøkonomiske fordele.

Bestemmelserne vedrørende godkendelser sikrer således, at risici som følge af anvendelsen af stoffer med meget problematiske egenskaber enten er under tilfredsstillende kontrol eller godkendes ud fra samfundsøkonomiske hensyn, idet der tages hensyn til foreliggende oplysninger om alternative stoffer eller processer, og i sådanne tilfælde vil godkendelserne normalt være tidsbegrænsede. Stoffer med meget problematiske egenskaber er defineret som: stoffer, der er kræftfremkaldende eller mutagene i kategori 1 og 2; stoffer, der er reproduktionstoksiske i kategori 1 og 2; stoffer, der er persistente, bioakkumulerende og toksiske eller meget persistente og meget bioakkumulerende; samt stoffer som f.eks. hormonforstyrrende stoffer, der er påvist at være tilsvarende problematiske.

Godkendelsesbestemmelserne kræver, at de, der anvender stoffer med meget problematiske egenskaber eller stiller sådanne til rådighed, ansøger om godkendelse for hver anvendelse inden for de af Kommissionen fastsatte frister. Der fastsættes frister for en række stoffer ad gangen. Disse stoffer er normalt dem, som anses for at udgøre den største nuværende risiko efter de kriterier, der er omhandlet i teksten. Hensigten er, at de stoffer, der udvælges, bør være dem med "Highest Expected Regulatory Outcome" (HEROS).

Bevisbyrden påhviler ansøgeren, der skal påvise, at risikoen ved anvendelse kontrolleres på passende måde, eller at de samfundsøkonomiske fordele mere end opvejer risiciene. Downstream-brugere kan anvende et stof til en godkendt anvendelse, hvis de erhverver stoffet fra en virksomhed, der har fået tildelt en godkendelse, og hvis de overholder betingelserne for

denne godkendelse. Sådanne downstream-brugere skal informere agenturet herom. Dette skal ske for at myndighederne får fuldt kendskab til, hvor og hvorledes meget problematiske stoffer anvendes.

1.8. Begrænsninger

Bestemmelserne vedrørende begrænsninger gør det muligt at indføre risikobegrænsende foranstaltninger i hele EU, hvis det påvises, at dette er nødvendigt. Bestemmelserne vedrørende begrænsninger fungerer som sikkerhedsnet for både REACH-systemet og fællesskabslovgivningen i helhed, fordi ethvert stof alene, i et præparat eller i en artikel kan underlægges EU-dækkende begrænsninger, hvis det er nødvendigt at gribe ind over for en risiko.

Forslag til begrænsninger kan bestå af betingelser for fremstilling, anvendelse(r) og/eller markedsføring af et stof eller af forbud mod disse aktiviteter, hvis det er nødvendigt. De udarbejdes af medlemsstaterne eller Kommissionen i form af et struktureret dossier. Dette dossier skal påvise, at der er risiko for menneskers sundhed eller miljøet, som det er nødvendigt at gribe ind over for på fællesskabsplan, og det skal redegøre for de forskellige muligheder for at styre denne risiko.

Bestemmelserne vedrørende begrænsninger er resultatet af en afvejning af behovet for at sikre, at der, når det er nødvendigt, skrides ind så hurtigt som muligt, behovet for at sikre et solidt videnskabeligt grundlag for eventuelle begrænsninger og behovet for give alle berørte parter mulighed for at deltage i proceduren.

Indtil nu har direktiv 76/769/EØF, som ændret, tilnærmet medlemsstaternes lovgivning vedrørende begrænsninger. De nuværende begrænsninger overtages nu i en omarbejdet version som udgangspunkt for den nye begrænsningsprocedure.

1.9. Det Europæiske Kemikalieagentur

Med disse bestemmelser oprettes Det Europæiske Kemikalieagentur (agenturet), der skal styre de tekniske og administrative aspekter af REACH-systemet og sikre konsekvens i beslutningstagningen på fællesskabsniveau.

Agenturet administrerer registreringsprocessen, spiller en central rolle med hensyn til at sikre konsekvensen i vurderingerne, opstiller kriterier til vejledning af medlemsstaterne ved udvælgelse af stoffer til vurdering og træffer afgørelser om krav om yderligere oplysninger om stoffer, der er ved at blive vurderet. Det afgiver også udtalelser og fremsætter anbefalinger i godkendelses- og begrænsningsprocedurerne, og det er underlagt forpligtelser med hensyn til fortrolighed.

I hvidbogen om en strategi for en ny kemikaliepolitik foreslog Kommissionen, at der oprettes en central enhed, der skulle administrere REACH-systemet og yde videnskabelig og teknisk støtte. Den foreslog også, at der blev gennemført en feasibility-undersøgelse vedrørende en sådan enhed. Denne undersøgelse vedrørte to hovedmodeller for enhedens opbygning: et udvidet Europæisk Kemikaliekontor (ECB) i Kommissionens Fælles Forskningscenter eller et uafhængigt centralt agentur. I undersøgelsen blev det konkluderet, at et uafhængigt centralt agentur ville indebære nogle fordele i forhold til et udvidet Kemikaliekontor.

Den første fordel, som agenturet ville have i forhold til et udvidet Kemikaliekontor, ville være at det vil kunne anvende indkomster fra gebyrer til at finansiere ansættelser, hvilket et udvidet Kemikaliekontor ikke ville kunne gøre. Kemikaliekontoret ville skulle modtage gebyrerne på

en særlig post i del B i Fællesskabsbudgettet. De andre fordele er nævnt i hvidbogen om nye styreformer i EU[2], hvori det anføres, at reguleringsorganer:

– forbedrer den måde, hvorpå regler anvendes og håndhæves i hele EU. Udvalgenes, sekretariatets og forummets arbejde vil komme til at opfylde dette mål.

– gør den pågældende sektor mere synlig. Det at der findes et særskilt uafhængigt organ, giver et klart fokus for drøftelser og giver derfor sektoren en mere synlig profil.

– Medfører en fordel med hensyn til at trække på meget teknisk knowhow i en bestemt sektor. Agenturet, navnlig udvalgene, sekretariatet og forummet giver en struktur, hvori denne knowhow kan udnyttes.

– Medfører omkostningsbesparelser for erhvervslivet. Agenturet har en klart defineret rolle og kan derfor koncentrere sig om at udvikle de mest omkostningseffektive metoder og dermed begrænse de gebyrer, som industrien pålægges.

– Gør det muligt for Kommissionen at fokusere på sine egne kerne-opgaver. Agenturets opgave er den tekniske gennemførelse af REACH, og dette er ikke en opgave, der passer til en tjenestegren i Kommissionen.

Den største fordel ved et udvidet kemikaliekontor ville være kontinuitet på kort sigt. Dette alene opvejer dog ikke fordelene ved et uafhængigt agentur, som arbejder på længere sigt. Derfor er løsningen med agenturet blevet valgt.

Ved fastlæggelsen af det nye agenturs opbygning tog Kommissionen hensyn til erfaringerne med allerede eksisterende agenturer på andre områder, især relaterede områder. Den fulgte også de principper, der indgår i dens nylige meddelelse om rammerne for europæiske reguleringsorganer[3]. Det Europæiske Agentur for Lægemiddelvurdering (EMEA) udgjorde den mest hensigtsmæssige model, fordi det er det agentur, hvis rolle ligger tættest på det foreslåede kemekalieagenturs rolle, idet det behandler en kontinuerlig strøm af produkter, der kræver vurdering, og idet der findes etablerede kompetente myndigheder i medlemsstaterne. Modellen for Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet har leveret nogle nyttige elementer til forslaget, men denne autoritet adskiller sig fra det foreslåede kemikalieagentur ved at en betydelig del af dets rolle består i at behandle specifikke problemer, efterhånden som de opstår, og inden for et område, hvor ikke alle medlemsstater allerede har haft myndigheder i længere tid. Der er også blevet udviklet en række nye elementer for at tage hensyn til specifikke forhold i kemikaliesektoren.

Agenturet vil være REACH-systemets ansigt udadtil og vil blive en central aktør med hensyn til at sikre, at der skabes tillid til systemet hos alle interessenter og i offentligheden.

Agenturet kommer til at omfatte følgende elementer:

– en bestyrelse med 15 medlemmer

– en administrerende direktør, der er ansvarlig over for bestyrelsen,

---

[2] KOM(2001) 428 endelig af 25.7.2001.
[3] KOM(2002) 718 endelig af 11.12.2002.

– et udvalg for risikovurdering, et udvalg for samfundsøkonomisk analyse og et medlemsstatsudvalg. Disse udvalg kan anmodes om at afgive udtalelser i henhold til vurderings-, godkendelses- og begrænsningsprocedurerne. Hver medlemsstat kan udpege et medlem til hvert udvalg.

– et forum til udveksling af oplysninger om håndhævelsesaktiviteter. Dette forum implementerer hvidbogens forslag om oprettelse af et net af håndhævende myndigheder. Forummets arbejdsopgaver er i alt væsentlighed en videreførelse af de opgaver, der tidligere har været udført at et uformelt net af medlemsstaternes myndigheder. Arbejdet på dette område skulle kunne drage fordel af at fungere inden for mere formelle rammer. Hver medlemsstat udpeger et medlem til forummet.

– et sekretariat, der yder teknisk, videnskabelig og administrativ støtte til udvalgene. Det skal også udføre en række arbejdsopgaver uden reference til udvalgene. At involvere udvalgene ville overbebyrde dem og ville ikke medføre en merværdi,

– Et appeludvalg, der skal behandle eventuelle indsigelser mod agenturets afgørelser.

Tiltrædelseslandene vil efter optagelse i EU være repræsenteret i bestyrelsen, udvalgene og forummet på samme grundlag som de nuværende medlemsstater.

1.10. Fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer

Bestemmelserne vedrørende en fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer sikrer, at klassificeringer (og deraf følgende mærkning) af alle farlige stoffer, der er fremstillet i eller importeres til EU, er tilgængelige for alle for at sikre, at REACH-systemet fungerer tilfredsstillende. Industrien vil blive pålagt at inkludere alle dens klassificeringer i fortegnelsen. Eventuelle afvigelser i klassificeringer af samme stoffer skulle forsvinde med tiden enten gennem samarbejde mellem anmeldere og registranter eller gennem EU-harmonisering. EU-harmoniserede klassificeringer kræves kun for følgende egenskaber: stoffer, der er kræftfremkaldende, mutagene eller reproduktionstoksiske i kategori 1, 2 og 3; eller luftbårne allergener.

1.11. Oplysninger

Disse bestemmelser sikrer, at ikke-fortrolige oplysninger om kemikalier er tilgængelige, f.eks. for at gøre det muligt for dem, der er eksponeret for kemikalier, at afgøre, om de dermed forbundne risici er acceptable. Dette sker på en sådan måde, at offentlighedens "ret til indsigt" afvejes med behovet for at holde visse oplysninger hemmelige.

1.12. Kompetente myndigheder

I henhold til disse bestemmelser skal der være myndigheder i alle medlemsstater med den nødvendige kompetence og de nødvendige midler til at udføre de opgaver, de får overdraget.

1.13. Håndhævelse

Disse bestemmelser sikrer, at en bred, fælles fremgangsmåde anvendes af alle medlemsstater med hensyn til håndhævelse af forordningen.

1.14. Overgangsbestemmelser og afsluttende bestemmelser

Disse bestemmelser sikrer, at forordningen træder i kraft på en praktisk og effektiv måde. Bestemmelserne sikrer en blød start samt indførelse af forordningens bestemmelser på en sådan måde, at de nuværende beskyttelsesniveauer ikke reduceres.

2. FORORDNINGENS INDHOLD

2.1. Generelle spørgsmål

Artikel 1 - formål

Denne artikel indeholder denne forordnings formål, nemlig at sikre, at det fælles marked for kemiske stoffer fungerer effektivt, samtidig med at det sikres, at menneskers sundhed og miljøet ikke lider skade som følge af fremstillingen eller anvendelsen af kemikalier under de med rimelighed forudsigelige betingelser. Denne forordning bygger på forsigtigheds-princippet, hvis anvendelsesbetingelser er omhandlet i Kommissionens meddelelse om forsigtighedsprincippet (KOM(2002) 1, endelig).

Artikel 2 - Anvendelsesområde

Radioaktive stoffer falder ikke ind under anvendelsesområdet, idet de er omfattet af anden lovgivning. Stoffer under toldkontrol, som er midlertidigt oplagret, befinder sig i frizoner eller på frilagre med henblik på reeksport eller i transit, anvendes ikke betydningen i REACH, og er derfor også udelukket. Ikke-isolerede mellemprodukter falder ikke ind under anvendelsesområdet. REACH tilvejebringer oplysninger om stoffer, og disse oplysninger vil være til støtte for lovgivningen om beskyttelse af arbejdstagere og transportlovgivningen, som fortsat er i kraft uændret.

Artikel 3 - Definitioner

De vigtigste begreber i denne forordning defineres.

2.2. Registrering af stoffer

Artikel 4 - Anvendelsesområde

Denne artikel undtager stoffer i anvendelser, hvor anden lovgivning kræver passende oplysninger. Stoffer i bilag II er undtaget, idet kendskabet til deres egenskaber og risici anses for at være tilstrækkeligt. Dette er i overensstemmelse med præcedens i nugældende EU-lovgivning. De fleste kategorier af stoffer i bilag III er undtaget, fordi de risici, som de medfører, vil blive behandlet via vurderingen af andre registrerede stoffer. Registrerede stoffer, der er blevet eksporteret fra Fællesskabet, og som bagefter reimporteres (f.eks. i præparater), er undtaget fra registrering, hvis reimportøren er i besiddelse af oplysninger til risikostyring, som påkrævet i henhold til forordningen. Endelig kræves der oplysninger for visse mellemprodukter. Dette behandles i kapitel 4.

Artikel 5 - Generel forpligtelse til at registrere stoffer alene eller i præparater

Denne artikel fastlægger den grundlæggende forpligtelse til at indsende en registrering til agenturet, som er den centrale modtagende myndighed i Fællesskabet. Denne forpligtelse gælder for producenter og importører, der er etableret i Fællesskabet, og som fremstiller eller importerer et stof i mængder fra 1 ton og opad pr. år. Under denne mængde er der ikke noget

krav om indsendelse af oplysninger, fordi den potentielle eksponering er begrænset, og fordi systemet skal kunne fungere i praksis. Ved at skabe et fremstillingsbaseret system fjerner man de nuværende problemer med reimport af anmeldte stoffer og fremmer beskyttelsen af arbejdstagerne. Monomerer skal registreres som ethvert andet stof, også selv om de anvendes som mellemprodukter, og det gøres klart, at de mere lempelige regler for mellemprodukter ikke gælder for monomerer. Dette er nødvendigt, fordi de polymerer, der er et resultat af deres anvendelse som mellemstoffer, ikke er underlagt krav om registrering. Desuden skal visse monomerer og andre stoffer, der endnu ikke er registreret, og som er til stede i polymerer med mere end 2%, registreres i henhold til denne artikel.

Artikel 6 - Generel forpligtelse til at registrere stoffer i artikler

I henhold til denne artikel er producenter eller importører af artikler forpligtede til at registrere stoffer inkorporeret i dem, hvis de opfylder kriterierne for klassificering som farlige stoffer, hvis de er beregnet til at frigives under normale og med rimelighed forudsigelige anvendelsesbetingelser, og hvis de er til stede i den pågældende artikeltype i mængder på 1 ton eller derover pr. år. Registreringskravene følger kravene til de forskellige grænseværdier som fastlagt i artikel 9.

Producenter og importører skal også underrette agenturet om visse nærmere specificerede oplysninger, hvis stoffer i artikler opfylder kriterierne for klassificering som farlige, vides at blive frigivet under normale og med rimelighed forudsigelige anvendelsesbetingelser, også selv om dette ikke er en tilsigtet funktion for den pågældende artikel, i mængder der kan skade menneskers sundhed eller miljøet, og er til stede i den pågældende artikeltype i mængder på 1 ton eller derover pr. år. Agenturet har mulighed for at kræve, at de pågældende producenter og importører registrerer sådanne anmeldte stoffer.

For at hjælpe de håndhævende myndigheder, herunder toldmyndighederne, med gennemførelsen af denne artikel, og for at fremme konsekvensen, indgår en udtrykkelig bestemmelse om udarbejdelse af yderligere lovgivning.

Artikel 7 - Fritagelse for den generelle registreringspligt for produkt- og procesorienteret forskning og udvikling (PPORD)

For at fremme innovation fritages stoffer, der anvendes til produkt- og procesorienteret forskning og udvikling. Fritagelsen gives for indtil 5 år og gælder for den mængde af et stof, der anvendes til produkt- og procesorienteret forskning og udvikling, og for en begrænset antal registrerede kunder. Visse oplysninger skal indgives til agenturet. Agenturet er ansvarlig for at kontrollere de modtagne oplysninger og pålægge eventuelle relevante betingelser. Fritagelsesperioden kan af agenturet forlænges med indtil 5 år efter ansøgning herom, hvis dette kan begrundes af forsknings- og udviklingsprogrammet. Hvis der er tale om udvikling af lægemidler, er der mulighed for en forlængelse med indtil 10 år. De kompetente myndigheder i de medlemsstater, i hvilke fremstillingen, importen eller den produkt- eller procesorienterede forskning og udvikling finder sted, modtager alle oplysninger, der er indsendt ved indgivelse af en anmodning om fritagelse i forbindelse med produkt- eller procesorienteret. Agenturet tager hensyn til de berørte kompetente myndigheders synspunkter, når det træffer afgørelse om fritagelser eller forlængelser i forbindelse med produkt- eller procesorienteret forskning og udvikling.

Der er ikke nødvendigt med en særskilt eksplicit undtagelse med hensyn til videnskabelig forskning og udvikling i mængder på under 1 ton om året, fordi fremstilling, import og

anvendelse af stoffer, også til dette formål, i mængder på indtil 1 ton om året allerede falder uden for anvendelsesområdet for forpligtelsen til at registrere.

Artikel 8 - Stoffer i plantebeskyttelsesmidler og biocidholdige produkter

Disse stoffer anses kun for at være registrerede i det omfang, at de anvendes i biocidholdige produkter og plantebeskyttelsesmidler, fordi den relevante lovgivning kræver indsendelse af fyldestgørende oplysninger. Downstream-brugere, der anvender disse stoffer som biocider eller plantebeskyttelsesmidler, anses for at anvende dem til en identificeret anvendelse i REACH-systemets betydning. Hvis en downstream-bruger derimod anvender et sådant stof til en uidentificeret anvendelse, skal han indberette denne anvendelse, og han kan bruge de oplysninger, som han har modtaget, til at gennemføre en kemisk sikkerhedsvurdering.

Artikel 9 - Oplysninger, der skal indsendes ved registrering

Der kræves oplysninger om registranten, stoffet og dets iboende egenskaber samt en sikkerhedsvurdering, inkl. foranstaltninger til risikostyring. En kemisk sikkerhedsrapport, inkl. oplysninger om risikostyringsforanstaltninger, kræves ved registrering af stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på over 10 tons om året pr. producent eller importør.

Bilag IV til IX indeholder kravene til generering af oplysninger om de stoffer, der skal registreres. Der findes nærmere oplysninger om disse bilag nedenfor.

Artikel 10 - Fælles indsendelse af data af medlemmer af konsortier

For at reducere omkostningerne for industrien og myndighederne tilskyndes der til indsendelse af data i fællesskab. Det mindre gebyr afvejer tilskyndelsen til fælles indsendelse med nødvendigheden af at sikre en tilstrækkelig indtægt til agenturets drift.

Artikel 11 - Oplysninger, der skal indsendes afhængig af tonnage

Oplysningskravene er opdelt i trin, fordi den potentielle eksponering øges med mængden. Kravene i stk. 2 sikrer, at de oplysninger, der er til rådighed for myndighederne, er ajourført, og finder anvendelse så snart en højere grænseværdi for tonnagen overskrides.

De oplysninger, der kræves for de forskellige tonnager, er en afbalancering af omkostningerne til udarbejdelse af sådan information og virkningerne i industrien med hensyn til den gevinst for menneskers sundhed og miljøet, som sandsynligvis vil kunne opnås som et resultat af oplysningerne.

I henhold til artikel 133, stk. 3, vil de oplysninger, der kræves for tonnager fra 1 til 10 tons, blive revideret i forbindelse med første revision af denne forordning 6 år efter agenturets oprettelse. Som et resultat af revisionen kan Kommissionen gennem en udvalgsprocedure ændre disse oplysningskrav. Det erkendes, at der i øjeblikket er store bestræbelser i gang for at udvikle alternative fremgangsmåder til identificering af de oplysninger, der er påkrævede til registreringer. F.eks. in vitro-metoder og brug af ((Q)SARs - (quantitative) structure activity relationships). Udviklingen af sådanne fremgangsmåde vil også indgå i eventuelle forslag til ændring af oplysningskravene for registrering for 1 til 10 tons.

Artikel 12 - Generelle krav til generering af oplysninger om stoffers iboende egenskaber

Denne artikel fastsætter de grundlæggende regler for generering af oplysninger, uanset om dette sker ved forsøg, (Q)SAR eller på anden måde. Forsøgsmetoderne i bilag X er godkendt

til anvendelse i henhold til gældende lovgivning og overføres derfor til REACH. Andre metoder kan anvendes, hvis registranten kan påvise, at de er egnede. Dette er især af betydning i tilfælde af data genereret før lovgivningens ikrafttrædelse, f.eks. for eksisterende stoffer eller for stoffer, der allerede fremstilles eller markedsføres uden for Fællesskabet. Ethvert nyt forsøg skal udføres i overensstemmelse med god laboratoriepraksis for at sikre oplysningernes kvalitet, og i overensstemmelse med lovgivningen vedrørende beskyttelse af dyr, der anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål.

Denne artikel kræver også, at registranter, der ønsker at henvise til data, der allerede er indsendt til agenturet, påviser, at de har tilladelse hertil fra ejeren af de pågældende data.

Artikel 13 - Kemisk sikkerhedsrapport og forpligtelse til at anvende og anbefale risikobegrænsende foranstaltninger

Den kemiske sikkerhedsrapport er en detaljeret udbygning af den kemiske sikkerhedsvurdering. Sikkerhedsvurderingen er en risikovurdering, i hvilken registranten tager hensyn til de risikostyringsforanstaltninger, som han enten selv gennemfører til eget formål eller anbefaler downstream-brugerne til at gennemføre til deres formål. De anvendelser, der indgår i registrantens kemiske sikkerhedsvurdering, benævnes identificerede anvendelser. Dette er ikke den klassiske model for risikovurdering, som dette forstås af folk, der i dag beskæftiger sig med regler for kemikalier. Benævnelserne "kemisk sikkerhedsrapport" og "kemisk sikkerhedsvurdering" er blevet valgt for at tydeliggøre denne forskel.

Af hensyn til proportionaliteten kræves der ikke kemiske sikkerhedsrapporter ved registrering af stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på under 10 tons om året pr. producent eller importør, på stedet isolerede mellemprodukter eller transporterede mellemprodukter. I artikel 133, stk. 1, gives Kommissionen beføjelser til at revidere anvendelsen af kravet på stoffer i disse mængder 12 år efter forordningens ikrafttrædelse.

En registrants kemiske sikkerhedsvurdering skal behandle alle anvendelser, som downstream-brugerne har identificeret over for registranten, medmindre han vælger ikke at levere stoffet til den pågældende anvendelse. Dette krav sikrer, at dem der skaber eller importerer stoffer ikke kan skubbe ansvaret for at vurdere en sikker styring af et stof over på downstream-brugere, som måske ikke råder over det rette udstyr til at gøre dette. Det letter også myndighedernes arbejde.

Visse anvendelser er det ikke nødvendigt at behandle i den kemiske sikkerhedsvurdering, idet de er tilstrækkeligt omhandlede i anden EU-lovgivning.

Det er ikke nødvendigt at foretage en kemisk sikkerhedsvurdering hvis stoffets koncentration i et præparat ligger under nærmere fastsatte koncentrationsgrænser, fordi stoffet under disse koncentrationsgrænser ikke anses for at udgøre en signifikant risiko for menneskers sundhed og miljøet. En kemisk sikkerhedsvurdering behøver kun omhandle trinnene eksponeringsvurdering og risikokarakterisering, hvis stoffet opfylder kriterierne for klassificering som et farligt stof eller vurderes at være et PBT-stof eller vPvB-stof. Dette fordi der kun i disse tilfælde er en signifikant risiko for menneskers sundhed eller miljøet.

Artikel 14 - Polymerer

I betragtning af de potentielt store antal registreringer af polymerer, og fordi de fleste af dem indebærer en begrænset risiko som følge af deres art, undtages polymerer fra

registreringkravet af praktiske grunde og for at gøre det muligt at koncentrere ressourcerne på mere problematiske stoffer. Kommissionen har dog forpligtet sig til at overveje, hvorledes polymerer kan indgå i REACH i fremtiden. Før der fremsættes et eventuelt forslag om at lade registreringskravet gælde visse polymerer, vil Kommissionen udarbejde en rapport, der behandler risiciene i forbindelse med polymerer sammenlignet med andre stoffer, og spørgsmålet om hvorvidt, under hensyntagen til balancen mellem beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet og sikring af konkurrenceevne og innovation, visse typer af polymerer bør registreres.

Artikel 15 og artikel 16 - Registrering af på stedet og transporterede isolerede mellemprodukter

Af praktiske grunde og for at koncentrere ressourcerne om mere problematiske stoffer indføres der med disse artikler et begrænset registrationskrav for visse isolerede mellemprodukter. Ikke-isolerede mellemprodukter er udelukket fra REACH.

Der skelnes mellem isolerede mellemprodukter, der forbliver på stedet, og isolerede mellemprodukter, der transporteres til andre steder under kontrollerede betingelser. For sidstnævnte type mellemprodukter kræves der flere oplysninger, hvis den transporterede mængde pr. producent pr. år er på over 1000 tons, fordi risikoen for eksponering potentielt er højere.

Artikel 17 - Fælles indsendelse af data af medlemmer af konsortier

Se forklaring under artikel 10.

Artikel 18 - Agenturets forpligtelser

I denne artikel defineres behandlingen af de indsendte registreringer og agenturets rolle i REACH-systemets registreringsfase. Registreringer indsendes og behandles elektronisk for at lette administrationen af mange tusinde registreringer. Agenturet er den centrale modtagende myndighed for alle registreringer. Det giver hver af dem et registreringsnummer og dato, og det foretager en fuldstændighedskontrol, som er af afgørende betydning i en automatiseret proces, igen som følge af det store antal registreringer, der skal behandles. Ved at lade fuldstændighedskontrollen udføre af agenturet sikres den nødvendige konsistens i fremgangsmåden i registreringsfasen. Agenturet meddeler registranten, om registreringen er ufuldstændig, og hvis dette er tilfældet, hvilke oplysninger, der mangler, og inden for hvilken frist registreringen skal være fuldstændig. Resultatet af fuldstændighedskontrollen videregives til den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor producenten eller importøren er etableret. Agenturet accepterer ikke registreringer udtrykkeligt, idet registreringen ikke er et godkendelsessystem.

Artikel 19 - Fremstilling og import af stoffer

Denne artikel forbyder fremstilling og import af stoffer, der ikke er registreret i overensstemmelse med bestemmelserne om registrering. Den tillader fremstilling eller import af et stof 3 uger efter registreringsdatoen, medmindre agenturet beslutter andet. Hvis agenturet anmoder om yderligere oplysninger, tillades fremstilling eller import af et stof fra 3 uger efter fremsendelse af sådanne yderligere oplysninger, medmindre agenturet angiver andet. Denne frist er valgt for at give tid til en fuldstændighedskontrol. Hvis en producent eller importør fungerer som "ledende" deltager i et konsortium, må de andre deltagere i konsortiet ikke fremstille eller importere stoffet, før fristen for den "ledende" registrant er udløbet.

Det er ikke nødvendigt med en længere frist til dette formål, fordi fuldstændighedskontrollen er ret automatiseret, og en længere frist ville betyde en unødig forsinkelse af fremstillingen eller importen af et nyt stof.

Artikel 20 - Andre forpligtelser, som påhviler registranterne

Med denne artikel pålægges registranten en forpligtelse til at meddele agenturet alle ændringer i nærmere bestemte elementer i registreringen. Den sikrer, at myndighederne modtager de seneste oplysninger om sikkerhed i forbindelse med kemikalier, mens den ikke kræver opdatering af mindre ændringer. Forpligtelsen til at indberette betydelige ændringer i fremstillede eller importerede mængder, giver væsentlig information til udviklingen af en indikator for kemikalier og betyder, at oplysningerne i databasen ajourføres. Som vigtig ny viden om risici i forbindelse med stoffet betragtes viden, der ville indebære en ændring i den kemiske sikkerhedsvurdering.

Artikel 21 - Særlige bestemmelser for indfasningsstoffer

Med denne artikel indfases langt de fleste af de stoffer, der i øjeblikket fremstilles eller markedsføres, i registreringssystemet. I betragtning af de store antal indfasningsstoffer er fristerne fastsat med henblik på at sikre, at processen er overkommelig for både industrien og myndighederne. Registreringsprocessen for indfasningsstoffer begynder med stoffer, der fremstilles eller importeres i store mængder, på grund af den store potentielle eksponering, samt med stoffer med meget problematiske egenskaber.

Artikel 22 - Anmeldte stoffer

Da kravene vedrørende anmeldelse i henhold til direktiv 67/548/EØF i alt væsentlighed er meget lig kravene vedrørende registrering, bestemmes det i denne artikel, at tidligere anmeldte stoffer skal betragtes som registrerede. Sådanne registreringer skal ajourføres på samme måde som andre registreringer. Det er hensigten, at agenturet skal sørge for, at de anmeldte data overføres til agenturets centrale database. Hvis sådanne stoffer senere overskrider den følgende, højere tærskelværdi i artikel 9, kræves der oplysninger i fuldt omfang som for ethvert andet stof, herunder oplysninger, der endnu ikke er indsendt for den lavere tærskelværdi.

2.3. Datadeling og undgåelse af unødvendige forsøg

Artikel 23 - Formål og generelle regler

Denne artikel omhandler de generelle principper for datadeling og for at sikre, at unødvendige dyreforsøg undgås. Stk. 2 sikrer, at der ikke opstår problemer i forhold til Fællesskabets konkurrenceregler. Stk. 3 giver agenturet mulighed for at stille data, som har været i agenturets besiddelse i mindst 10 år, gratis til rådighed for andre til registreringsformål.

Artikel 24 - Pligt til at forespørge før registrering

Denne artikel sætter potentielle registranter af et stof, som de ikke allerede har fremstillet eller markedsført ved ikrafttrædelsen af REACH-systemet, i stand til at indhente data fra tidligere registranter af stoffet. Der kræves betaling for data inden for en periode på 10 år efter den første registrering, der indeholder de relevante data, fordi dette er den periode, hvor en innovativ registrant har mest at vinde ved markedsføring af stoffet.

Artikel 25 - Deling af eksisterende data, hvori indgår forsøg med hvirveldyr, mellem registranter

Registranterne anspores til at nå til enighed om deling af data, enten direkte eller gennem en voldgiftsinstans. I betragtning af dyrebeskyttelsen store betydning har agenturet dog beføjelse til at stille oplysninger til rådighed for den efterfølgende registrant, hvis der ikke opnås enighed. Den efterfølgende registrant forventes at betale en ligelig andel af omkostningerne. Hvis det er nødvendigt, kan den første registrant via de nationale retsinstanser fremsætte et krav over for den efterfølgende registrant om betaling af en ligelig andel af omkostningerne i forbindelse med frembringelsen af oplysningerne.

Artikel 26 - Forpligtelse til præregistrering af indfasningsstoffer

Registranter, der ønsker at benytte sig af indfasningsbestemmelserne i kapitlet om registrering, skal præregistrere oplysninger om deres stoffer for derved at muliggøre deling af data, der allerede foreligger. Denne bestemmelse gør det muligt for producenter og importører af stoffer i mængder på under 1 ton frivilligt at bidrage til datadelingen.

Artikel 27 - Forummer til udveksling af oplysninger om stoffer

Med denne artikel etableres et forum til udveksling af oplysninger om stoffer (SIEF - Substance Information Exchange Forum), der består af alle dem, der har præregistreret samme stof, og den pålægger deltagerne forpligtelser for at undgå gentagelse af dyreforsøg.

Artikel 28 - Deling af data, hvori indgår forsøg med hvirveldyr

I denne artikel fastlægges det, hvilke trin deltagerne i et SFIE skal følge for at opfylde deres forpligtelser. Det skal bemærkes, at bestemmelserne i stk. 3 kun præsenteres for at tydeliggøre, hvilke skridt de andre deltagere i et SFIE kan tage, hvis ejeren af en undersøgelse nægter at videregive oplysninger. I et sådant tilfælde misligholder ejeren af undersøgelsen sine forpligtelser og vil kunne pålægges sanktioner. Hvis ejeren af en undersøgelse allerede har indsendt sin registrering indeholdende undersøgelsen, stiller agenturet denne til rådighed for andre deltagere i SIEF'et.

2.4. Oplysninger i forsyningskæden

Artikel 29 - Krav til sikkerhedsdatablade

I denne artikel forklares det, at sikkerhedsdatabladet er det instrument, der skal bruges til videregivelse af relevante oplysninger fra producenten, importøren eller downstream-brugeren nedad i forsyningskæden. Sikkerhedsdatabladene er det bedste instrument hertil, fordi de er kendte og forstås af alle aktører i forsyningskæden, og et krav om et nyt instrument ville øge omkostningerne og kun medføre en ringe gevinst for menneskers sundhed eller miljøet. De nuværende forpligtelser og det nuværende ansvar i forbindelse med sikkerhedsdatablade bevares og vil blive udvidet med kravet om at videregive oplysninger fra enhver relevant kemisk sikkerhedsvurdering.

Det erkendes, at udarbejdelsen af et sikkerhedsdatablad for et præparat, der indeholder mange registrerede stoffer, kan være en kompliceret affære. Man kan derfor ved udarbejdelsen af et sikkerhedsdatablad for et præparat vælge at foretage en kemisk sikkerhedsvurdering for præparatet i sin helhed og lade sikkerhedsdatabladet bygge på denne kemiske sikkerhedsvurdering i stedet for de enkelte sikkerhedsvurderinger for alle de registrerede komponenter i præparatet.

De 16 overskrifter, der kræves for sikkerhedsdatablade er i overensstemmelse med dem, der indgår i det globalt harmoniserede system (GHS) til klassificering og mærkning af kemikalier. Hvis der er blevet gennemført en kemisk sikkerhedsvurdering, giver de relevante eksponeringsscenarier deri nyttige og strukturerede oplysninger til andre i forsyningskæden. Det er derfor meningen, at de skal indgå i et bilag til sikkerhedsdatabladet.

Artikel 30 - Forpligtelse til at videregive oplysninger nedad i forsyningskæden vedrørende stoffer og præparater, for hvilke der ikke kræves et sikkerhedsdatablad

Downstream-brugere og distributører har brug for visse oplysninger om stoffer, også selv om der ikke kræves et sikkerhedsdatablad, således at de kan træffe de fornødne foranstaltninger. Det kan f.eks. være nærmere oplysninger om registreringen af et stof, således at de kan sikre, at deres anvendelse er i overensstemmelse med eventuelle godkendelser eller begrænsninger. Disse oplysninger skal opdateres i tide, således at der kan træffes passende foranstaltninger.

Artikel 31 - Forpligtelse til at videregive oplysninger om stoffer og præparater opad i forsyningskæden

Denne artikel specificerer, hvilke oplysninger, der skal videregives opad i forsyningskæden. Oplysninger skal videregives opad i forsyningskæden, således at de opstillede risikobegrænsende foranstaltninger om nødvendigt kan forbedres. Der kan f.eks. være tale om oplysninger vedrørende eksponering, supplerende oplysninger om et stofs virkninger, eller oplysninger om, hvorledes de risikobegrænsende foranstaltninger virker i praksis.

Det i forordningen omhandlede system vil være mest effektivt, hvis oplysninger videregives i hele forsyningskædens længde og i begge retninger.

Artikel 32 - Arbejdstagernes adgang til oplysningerne i sikkerhedsdatablade

Oplysningerne i sikkerhedsdatablade samt oplysninger i henhold til artikel 30, hvis der ikke kræves et sikkerhedsdatablad, skal stilles til rådighed for arbejdstagerne og deres repræsentanter. At stille sikkerhedsdatabladene til rådighed for arbejdstagerne og deres repræsentanter er i overensstemmelse med GHS.

Artikel 33 - Forpligtelse til at opbevare oplysninger

Alle aktører i forsyningskæden skal opbevare alle oplysninger genereret i henhold til forordningen og på anmodning stille dem til rådighed. Disse oplysninger skal holdes samlet, således at myndighederne har let og hurtig adgang til dem, og derfor hurtigt kan træffe eventuelle foranstaltninger, der kan være med til at beskytte menneskers sundhed og miljøet, og således at det sikres, at alle relevante oplysninger er til rådighed, når der skal træffes beslutninger i andre dele af systemet (f.eks. vurderinger, begrænsninger, godkendelser).

2.5 Downstream-brugere

Artikel 34 - Downstream-brugernes kemiske sikkerhedsvurderinger og forpligtelse til at anvende og anbefale risikobegrænsende foranstaltninger

Systemet for registrering og især de kemiske sikkerhedsvurderinger er blevet udformet på en sådan måde, at producenter og importører ikke kan overføre ansvaret for udarbejdelsen af kemiske sikkerhedsvurderinger til downstream-brugerne, hvis disse ikke ønsker, at de skal gøre dette. Downstream-brugerne kan selvfølgelig hjælpe deres leverandører med udarbejdelsen af en registrering, og denne mulighed indgår udtrykkeligt i teksten. Hvis

downstream-brugeren ønsker, at leverandørens kemiske sikkerhedsvurdering skal omfatte hans anvendelser, bør han meddele ham dette skriftligt. Derved gøres downstream-brugerens anvendelse til en identificeret anvendelse, og den skal derfor, efter tilstrækkeligt varsel, være omfattet af producentens eller importørens kemiske sikkerhedsvurdering.

Downstream-brugere skal udarbejde kemiske sikkerhedsrapporter i overensstemmelse med bilag XI for anvendelser, der ikke falder ind under de betingelser, der indgår i det sikkerhedsdatablad, som de har modtaget. Denne bestemmelse gør det muligt for downstream-brugerne at hemmeligholde deres anvendelse(r) over for leverandøren, hvis de ønsker dette. Downstream-brugerne behøver dog ikke udarbejde en kemisk sikkerhedsrapport:

– hvis de gennemfører grundigere risikostyringsforanstaltninger end dem, der er anbefalet af deres leverandør, fordi der i sådanne tilfælde ikke reelt opnås noget ved en forpligtelse til at udarbejde en kemisk sikkerhedsrapport, eller

– hvis der er tale om ikke-farlige stoffer, eller

– hvis leverandøren ikke ville skulle udarbejde en kemisk sikkerhedsrapport.

Downstream-brugerne skal gennemføre de risikobegrænsende foranstaltninger, der er anført i sikkerhedsdatabladet, for identificerede anvendelser, og dem, der er anført i deres kemiske sikkerhedsvurdering, for uidentificerede anvendelser. Oplysninger om risikobegrænsende foranstaltninger anført i sikkerhedsdatabladet for identificerede anvendelser eller identificeret i downstream-brugernes kemiske sikkerhedsvurdering for uidentificerede anvendelser skal, hvor det er relevant, videregives til deres downstream-brugere, således at disse også kan anvende de identificerede risikobegrænsende foranstaltninger eller, hvis deres anvendelse ikke er dækket heraf, gennemføre deres egen kemiske sikkerhedsvurdering.

Artikel 35 - Forpligtelse for downstream-brugere til at fremsende oplysninger

Hvis downstream-anvendelsen ligger uden for de betingelser, der er beskrevet i eksponeringsscenariet i et sikkerhedsdatablad, som han har modtaget, skal downstream-brugeren indberette anvendelsen til agenturet.

Rapportens omfang er begrænset for at reducere den byrde, som industrien og myndighederne pålægges, mest muligt. Den skal imidlertid være tilstrækkelig til at myndighederne kan afgøre, om der skal foretages yderligere, f.eks. under anvendelse af bestemmelserne vedrørende vurdering eller begrænsninger, eller om der skal iværksættes en håndhævelsesforanstaltning. En rapport kan i nogle særlige tilfælde indeholde forslag til forsøg. Hvis sådanne forsøg bygger på bilag VII eller VIII, foretager myndighederne en vurdering af sagen.

En downstream-bruger kan ved gennemførelse af en kemisk sikkerhedsvurdering eller på anden måde konkludere, at klassificeringen og etiketteringen af et stof adskiller sig fra de oplysninger, som han har modtaget fra leverandøren. Dette skal meddeles agenturet.

Der anvendes et forud fastlagt format til rapporterne for at hjælpe downstream-brugerne med at opfylde deres forpligtelser og sætte agenturet i stand til effektivt at behandle et potentielt stort antal rapporter fra downstream-brugere.

Ajourføring af rapporter sikrer, at agenturet, og derved de kompetente myndigheder i medlemsstaterne, har kendskab til de seneste relevante oplysninger vedrørende anvendelsen af et stof, og derfor om nødvendigt kan gribe ind på passende vis.

Downstream-brugerne skal ikke foretage indberetninger, hvis de anvender stoffer i mængder på under 1 ton.

Artikel 36 - Anvendelse af bestemmelserne om downstream-brugernes forpligtelser

Downstream-brugere vil modtage oplysninger vedrørende sikker anvendelse af deres stoffer gennem de sikkerhedsdatablade, der leveres af deres leverandører. De bør også allerede have udført en risikovurdering med hensyn til beskyttelse af arbejdstagerne i overensstemmelse med direktiv 98/24/EF. Det er dog sikrest at udskyde anvendelsen af bestemmelserne i artikel 35 for at give nye sikkerhedsoplysninger tid til at bevæges ned gennem forsyningskæden og give downstream-brugerne tid til at udfylde og om nødvendigt ajourføre deres risikovurderinger eller kemiske sikkerhedsvurderinger. Anvendelsen af bestemmelserne i artikel 36 udsættes til efter registreringen af et stof for at undgå unødig rapportering.

2.6. Vurdering af stoffer

Artikel 37 - Anvendelsesområde

Da polymerer er undtaget fra registrering, er de også undtaget fra vurdering. Denne undtagelse vil dog også indgå i den revidering, der er omhandlet i artikel 133, stk. 3, og kan ændres i overensstemmelse hermed.

Artikel 38 - Den kompetente myndighed

Denne artikel beskriver, hvorledes det bestemmes, hvilken medlemsstatsmyndighed, der skal foretage vurderingen.

For så vidt angår dossier-vurderinger er det den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor fremstillingen finder sted, eller hvor importøren er etableret. Grunden hertil er, at dossierne behandles individuelt, og at man undgår sprog- og kommunikationsproblemer. Hvis der er tale om konsortier, er det den kompetente myndighed i den medlemsstat, der har ansvaret for "lederens" dossier, der er den kompetente myndighed med hensyn til vurdering.

For så vidt angår stofvurderinger gælder en anden regel: medlemsstaterne skal udarbejde rullende planer, der dækker en periode på tre år, og anføre de stoffer, som de har til hensigt at vurdere. Dette sker for at sætte medlemsstaterne i stand til planlægge og afsætte ressourcer til stofvurderinger. Der er indført en særlig tildelingsmekanisme for det tilfælde, at mere end en medlemsstat har planer om at vurdere det samme stof, for at undgå dobbeltarbejde og tilskynde til hurtig vurdering af det pågældende stof. En af de faktorer, der tages hensyn til ved anvendelsen af denne mekanisme, er de enkelte medlemsstaters andel af Fællesskabets samlede bruttonationalprodukt.

Artikel 39 - Behandling af forslag til forsøg

I henhold til denne artikel skal den vurderende myndighed gennemføre en dossier-vurdering af alle forslag til forsøg, der skal udføres for at opfylde oplysningskravene i bilag VII og VIII. Disse bilag er valgt, fordi de indeholder de forsøg, der er de dyreste, og som kræver anvendelse af det største antal hvirveldyr. Det er derfor vigtigt af hensyn til dyrevelfærden, at myndighederne er overbeviste om, at sådanne forsøg er hensigtsmæssige. Erfaringerne med den nuværende lovgivning har desuden vist, at der sjældent er uoverensstemmelse mellem industrien og myndighederne om, hvorvidt de dyreforsøg, der nu er indeholdt i bilag V og VI, skal foretages.

Downstream-brugere kan foreslå forsøg, hvis deres anvendelse af et stof ikke er en identificeret anvendelse, og derfor ikke er omfattet af oplysningerne i sikkerhedsdatabladet.

Hvis myndigheden accepterer et forslag, udarbejder den et udkast til afgørelse om udførelse af forsøget og fastsætter en frist herfor. Dette sker for at registrantens forpligtelser skal være klare og for at andre myndigheder kan vide, hvornår dataene foreligger.

Artikel 40 - Overensstemmelseskontrol af registreringer

En kompetent myndighed kan kontrollere at enhver registrering, som den har ansvaret for, er i overensstemmelse med kravene i forordningen. Hvis dette ikke er tilfældet kan myndigheden udarbejde et udkast til en afgørelse, der kræver, at registranten indgiver de manglende oplysninger. Oplysninger er manglende, hvis der ikke er indsendt data, eller hvis de indsendte data er utilstrækkelige.

Artikel 41 - Kontrol af indsendte oplysninger og opfølgning af dossier-vurdering

Når eventuelt yderligere oplysninger som påkrævet i henhold til artikel 39 og 40 er blevet indgivet, gennemgår den kompetente myndighed registreringen og yderligere oplysninger og udarbejder et udkast til endnu en afgørelse, hvis der er brug for endnu flere oplysninger.

Når et dossier er blevet vurderet, kan den kompetente myndighed beslutte, at der skal træffes yderligere foranstaltninger for at styre det pågældende stof. Disse kan være i form af forslag om anvendelse af godkendelses- eller begrænsningsprocedurerne eller i form af videregivelse af relevante oplysninger til myndigheder med ansvar for lovgivningen på andre områder.

Artikel 42 - Procedure og frister for behandling af forslag til forsøg

I denne artikel fastsættes en frist på 120 dage til gennemførelse af dossier-vurderinger af forslag til forsøg i forbindelse med ikke-indfasningsstoffer. Dette sker for at sikre, at industrien modtager tilladelse til at gennemføre eventuelle forsøg og således kan indsamle alle relevante oplysninger inden for de fastsatte frister. Der fastsættes også frister for udførelse af dossier-vurderinger af forslag til forsøg i forbindelse med indfasningsstoffer for at gøre systemet mere forudsigeligt og gennemskueligt for alle interessenter.

Der gives forrang til vurderinger af forslag til forsøg ud fra nødvendigheden af at overholde de fastsatte frister og den store betydning af dyrebeskyttelse.

Artikel 43 - Procedure og frister for overensstemmelseskontrol

En kompetent myndighed har en frist på højst 12 måneder efter påbegyndelsen til at afslutte en overensstemmelseskontrol, herunder udarbejdelse af et udkast til afgørelse.

Artikel 44 - Anmodning om yderligere oplysninger

Denne artikel gør det muligt for den ansvarlige kompetente myndighed at udarbejde et udkast til afgørelse, der kræver yderligere oplysninger for at gøre det klart, om et stof udgør en særlig risiko for menneskers sundhed eller miljøet. Det kan f.eks. vise sig, at stoffet ligner et andet stof, der har særlige egenskaber, der endnu ikke er blevet identificeret for det pågældende stof.

En kompetent myndighed har en frist på højst 12 måneder til at afslutte en stofvurdering, herunder udarbejdelse af et udkast til afgørelse.

Artikel 45 - Kohærens med andre aktiviteter

For at sikre konsekvens i beslutningstagningen skal der i en vurdering tages hensyn til eventuelt tidligere vurderinger af stoffet. Enhver afgørelse i forbindelse med vurderingen, der kræver yderligere oplysninger om et stof, der tidligere er blevet vurderet, kan kun begrundes, hvis der foreligger nye oplysninger, eller hvis forholdene har ændret sig.

Artikel 46 - Kontrol af indsendte oplysninger og opfølgning af stofvurderingen

Når eventuelt yderligere oplysninger, som er påkrævede i henhold til artikel 44, er blevet indgivet, behandler den kompetente myndighed registreringen/registreringerne og yderligere oplysninger og udarbejder udkast til endnu en afgørelse, hvis der er brug for endnu flere oplysninger.

Når et dossier er blevet vurderet, kan den kompetente myndighed beslutte, at der skal træffes yderligere foranstaltninger for at styre det pågældende stof. Disse kan være i form af foranstaltninger i henhold godkendelses- eller begrænsningsprocedurerne eller i form af videregivelse af relevante oplysninger til myndigheder med ansvar for lovgivningen på andre områder.

Artikel 47 - Yderligere oplysninger om på stedet isolerede mellemprodukter

Af praktiske grunde undtager denne artikel isolerede mellemprodukter på stedet fra dossier- og stofevaluering. Medlemsstaterne kan imidlertid anmode om yderligere oplysninger og træffe de nødvendige foranstaltninger vedrørende et sådant stof, hvis de kan påvise, at dets anvendelse indebærer en risiko, som er problematisk på samme niveau som brugen af stoffer, der kræver godkendelse.

Artikel 48 - Registranternes rettigheder

Registranter og downstream-brugere, der potentielt berøres af en vurderingsafgørelse, har ret til at kommentere det udkast til afgørelse, der udarbejdes af en kompetent myndighed, og sådanne kommentarer skal tages i betragtning.

Under normale omstændigheder er en registrant ikke ansvarlig for at frembringe de yderligere oplysninger, der kræves til vurderingen, hvis han enten er ophørt med fremstillingen eller importen af stoffet, og har meddelt agenturet dette, eller hvis han beslutter at ophøre med fremstillingen eller importen af stoffet som følge af kravet om yderligere oplysninger som et resultat af vurderingen, og har meddelt agenturet dette. Kun hvis der er en potentiel risiko for mennesker og miljø på længere sigt, og hvis den pågældende registrant er ansvarlig for at have bidraget væsentligt til eksponeringen for det pågældende stof, er registranten ansvarlig for tilvejebringelse af yderligere oplysninger. Dette for at undgå, at registranter pålægges ansvar med tilbagevirkende kraft, bortset fra i ekstreme tilfælde.

Artikel 49 - Vedtagelse af afgørelser under vurderingerne

Med denne artikel skabes en procedure for at sikre enighed om vurderingsafgørelser blandt medlemsstaternes kompetente myndigheder, før sådanne afgørelser træffes af agenturet, uden at det er nødvendigt med en tidskrævende og ressourceintensiv komitologiprocedure i hver enkelt sag. Hvis der ikke kan opnås enighed, udgør agenturets medlemsstatsudvalg et teknisk forum til løsning af uoverensstemmelser, også her uden anvendelse af komitologi. Agenturets administrerende direktør har ret til at igangsætte denne procedure for at sikre konsekvens i

afgørelserne. Enhver medlemsstat kan kræve, at en afgørelse træffes via komitologi-proceduren.

Artikel 50 - Omkostningsdeling ved gennemførelse af forsøg, hvori indgår hvirveldyr, uden opnåelse af aftale mellem registranterne

Af hensyn til dyrevelfærden er det af afgørende betydning at sikre, at oplysninger deles. Dette forudsætter, at også omkostningerne deles. Denne artikel sikrer, at omkostninger og oplysninger deles, når der kræves yderligere oplysninger i forbindelse med vurderingen. En voldgiftsinstans kan evt. anvendes til at afgøre krav om godtgørelse. Hvis der ikke kan opnås enighed om omkostningsdeling, afgøres sagen ved de nationale domstole.

Artikel 51 - Medlemsstaternes forpligtelse til at rapportere til agenturet

For at sikre, at byrderne fordeles rimeligt, udarbejder hver medlemsstat hvert år en rapport om de vurderinger af forsøgsforslag, der er gennemført det forudgående år.

2.7. Godkendelse

Artikel 52 - Målet med godkendelser

Målet med godkendelsessystemet er at sikre, at det indre marked fungerer efter hensigten og at stoffer med meget problematiske egenskaber enten anvendes på en måde, hvor risiciene styres på passende vis, eller erstattes af egnede alternative stoffer eller teknologier. Hensigten med dette mål er forklaret ovenfor i punkt 1.7.

Artikel 53 - Almindelige bestemmelser

I denne artikel specificeres det, at stoffer i bilag XIII kun må anvendes og markedsføres af de virksomheder, som har opnået tilladelse hertil, samt af deres kunder, og kun til de anvendelser, som godkendelsen gælder for, og i overensstemmelse med eventuelle betingelser angivet i godkendelsen, medmindre en bestemt anvendelse af det pågældende stof er blevet undtaget fra kravet om godkendelse.

Stoffer med meget problematiske egenskaber, som der kræves godkendelse til, men som endnu ikke indgår i bilag XIII, kan fortsat anvendes, forudsat at de opfylder de andre krav, som de er underlagt i henhold til forordningen og anden relevant lovgivning.

Godkendelsesprocessen finder ikke anvendelse på stoffers anvendelse i præparater, hvor stoffet ikke er til stede i tilstrækkelige koncentrationer til at præparatet skal klassificeres som havende en af de egenskaber, der gør, at stofferne alene ville være underlagt godkendelse. Den finder heller ikke anvendelse på PBT- eller vPvB-stoffer, der er til stede i koncentrationer på under 0,1%, idet denne grænse er den samme som for CMR-stoffer.

For at bidrage til at fremme innovation finder godkendelsesprocessen ikke anvendelse på stoffer, der udelukkende anvendes til videnskabelig forskning og udvikling eller til produkt- og procesorienteret forskning og udvikling i mængder på under 1 ton.

Visse anvendelser af stoffer kræver ikke godkendelse, fordi deres indvirkning på menneskers sundhed og miljøet anses for at være omfattet af tilsvarende fællesskabslovgivning. Det ville være urimeligt at underlægge sådanne anvendelser to systemer med de omkostninger og det ressourceforbrug, som dette ville medføre. Kommissionen vil foreslå en ændring af lovgivningen om human- og veterinærmedicinske lægemidler for at inddrage miljørelaterede

risici. Dette vil indgå i en benefit/risiko-vurdering, som skal være positiv, for at det medicinske lægemiddel kan godkendes.

Den fællesskabslovgivning, der beskæftiger sig med anvendelser i kosmetiske produkter og i materialer, der kommer i berøring med fødevarer, vedrører imidlertid kun virkningerne for menneskers sundhed. Selv om disse virkninger ikke behøves at behandles igen, kræver et stof til disse anvendelser, hvis det identificeres som et PBT, vPvB eller et tilsvarende miljøproblematisk stof, godkendelse med hensyn til disse virkninger, fordi miljøvirkningen ikke tidligere er blevet behandlet.

Artikel 54 - Stoffer, der skal optages i bilag VIII

Denne artikel specificerer de egenskaber ved stoffer, der gør, at de er underlagt godkendelsesprocessen. Der findes klare og objektive kriterier til bestemmelse af stoffer, der er kræftfremkaldende, mutagene eller reproduktionstoksiske i kategori 1, 2 og 3 samt af nogle PBT'er og vPvB'er. Der findes imidlertid nogle PBT'er og vPvB'er, som det ikke er muligt at identificere ved anvendelse af de numeriske kriterier i forordningen. Andre stoffer, der er tilsvarende problematiske, er det heller ikke muligt at identificere gennem objektive kriterier, selv om nogle hormonforstyrrende stoffer allerede vil være blevet identificeret gennem CMR-kriterierne. Hvis disse kan identificeres på videnskabelig eller teknisk vis fra sag til sag og anses for at være problematiske med hensyn til deres indvirkninger på menneskers sundhed og miljøet på samme niveau som de stoffer, der er identificeret ved anvendelse af de objektive kriterier, underlægges de også godkendelsesprocessen. PBT-stoffer, vPvB-stoffer og andre stoffer, der anses for at være tilsvarende problematiske (f.eks. visse hormonforstyrrende stoffer) identificeres fra sag til i overensstemmelse med den proces, der er omhandlet i artikel 56.

Persistente organiske miljøgifte (POP-stoffer) kræver som en undergruppe af vPvB-stoffer godkendelse. Stokholm-konventionen kræver imidlertid, at der etableres obligatoriske begrænsninger for særlige POP-stoffer. Anvendelsen af obligatoriske begrænsninger for særlige POP-stoffer er imidlertid uforenelig med godkendelsesprocessen; en virksomhed vil jo ikke ansøge om en godkendelse til en anvendelse, hvis den ved, at denne godkendelse ikke vil blive givet. Disse POP-stoffer vil derfor være underlagt begrænsninger under begrænsningsprocessen for at sikre, at Fællesskabet opfylder sine forpligtelser i henhold til Stockholm-konventionen og De Forenede Nationers Økonomiske Komité for Europa (UNECE).

Artikel 55 - Optagelse af stoffer i bilag XIII

I denne artikel specificeres, hvilke oplysninger der skal anføres i bilag XIII, når et stof optages i bilaget: først og fremmest stoffets identitet samt de egenskaber, der gør, at det falder ind under systemet. Da det må forventes, at meget få nye stoffer, eller slet ingen, med disse egenskaber vil blive markedsført, da de fleste af stofferne med disse meget problematiske egenskaber allerede har været anvendt. Det er derfor nødvendigt med overgangsordninger for disse stoffer, der allerede er på markedet på det tidspunkt, hvor et stof optages i bilaget, for ikke at tvinge virksomheder til indstille deres virksomhed, indtil de har opnået en godkendelse. I bilaget specificeres derfor en "solnedgangsdato" og en deadline. "Solnedgangsdatoen" er den dato, hvorefter ikke-godkendte anvendelser vil være forbudte. Dette er nødvendigt for at myndigheder og ansøgere kan planlægge på grundlag af en viden om, hvornår en afgørelse skal træffes. Deadlinen er den dato, hvor ansøgninger om fortsat anvendelse af stoffet skal være modtaget. Også dette giver sikkerhed for ansøgerne ved planlægningen af udfærdigelsen af deres ansøgning og for myndighederne ved planlægningen

af det arbejde, der er nødvendigt for at behandle en ansøgning. Hvis ansøgninger om godkendelse modtages inden den fastsatte deadline, må de pågældende anvendelser fortsætte, indtil en afgørelse er truffet, også selv om dette først sker efter "solnedgangsdatoen". Dette skal sikre, at virksomheder ikke automatisk får anvendelser forbudt, hvis myndighederne ikke har truffet en afgørelse.

Visse anvendelser kan fritages for kravet om godkendelse. En sådan afgørelse skal f.eks. tage hensyn til anvendelsen af anden EU-lovgivning vedrørende den pågældende anvendelse og til, om anvendelsen er tilstrækkeligt styret, og således sikrer en tilstrækkelig styring af risiciene for menneskers sundhed og miljøet. Dette skulle gøre det muligt for godkendelsesprocessen af koncentrere sig om brugen af de stoffer, som sandsynligvis indebærer de største risici, i stedet for at anvende ressourcer til at behandle anvendelser, som man ved, er underlagt tilstrækkelig styring, og det er i overensstemmelse med proportionalitetsprincippet. Hvis det som en følge af REACH-systemet eller udviklingen af fællesskabslovgivningen viser sig, at der er begrundelse for at undtage andre anvendelser fra godkendelseskravene, kan sådanne undtagne anvendelser tilføjes bilagene senere i overensstemmelse med artikel 130.

Selv om godkendelsesprocessen er konstrueret til at behandle meget problematiske stoffer, vil der stadig være stoffer, der er mere problematiske end andre. Processen skal først og fremmes være rettet mod stoffer med "highest expected regulatory outcome" (HERO), dvs. stoffer, hvor kontrol vil få en større virkning for beskyttelsen af menneskers sundhed og miljøet. Agenturet udarbejder et udkast til en liste over prioriterede stoffer til optagelse i bilag XIII, således at der foreligger et teknisk grundlag for en politisk afgørelse truffet af medlemsstaterne. Der gives prioritet til stoffer med PBT- eller vPvB-egenskaber, stoffer med udbredt anvendelse eller anvendelse i store mængder. Tredjeparter får lejlighed til at kommentere udkastet til denne liste. Denne liste og den endelige liste, som der opnås enighed om gennem forskriftsproceduren, skal tage hensyn til de ressourcer, som myndighederne har til rådighed til behandling af ansøgninger om godkendelse. Hvis listen omfatter for mange stoffer og/eller fristerne er for korte, vil systemet ikke være i stand til at klare opgaven. Der opnås derfor intet ved at optage flere stoffer i bilag XIII end der med rimelighed kan behandles.

Før optagelse i bilag XIII kan ethvert stof, der kræver godkendelse, blive gjort til genstand for begrænsningsprocessen, idet der kan være risici, der skal håndteres på fællesskabsniveau, før der træffes en afgørelse om eventuel godkendelse. Når først stoffer er optaget i bilag XIII, kan de ikke underlægges begrænsningsprocessen, idet risiciene for menneskers sundhed og miljøet tackles ud fra de iboende egenskaber omhandlet i artikel 54. Hvis visse anvendelser af disse stoffer ikke kræver godkendelse, tilføjes betingelserne for sådanne anvendelser i bilag XIII, når disse anvendelser er undtaget fra kravet om godkendelse. Stoffer, for hvilke alle anvendelser er forbudte, forbydes under de generelle begrænsninger i afsnit VIII. Et eksempel herpå er POP-stoffer. Disse kan have været underlagt godkendelse, men i henhold til Stokholm-konventionen kan det, når de er tilføjet listen over POP-stoffer, i de fleste tilfælde være nødvendigt at forbyde dem eller på anden måde fastsætte begrænsninger for dem. Dette skal ske gemmen begrænsningsprocessen.

Artikel 56 - Identificering af de stoffer, der er henvist til i artikel 54 (d), (e) og (f)

Denne artikel omhandler den proces hvorved PBT-stoffer, vPvBs-stoffer eller andre stoffer, som fra sag til sag anses for at være problematiske på samme niveau med hensyn til deres indvirkning på menneskers sundhed og miljøet (f.eks. visse hormonforstyrrende stoffer), skal identificeres på fællesskabsniveau og aftales på fællesskabsniveau, før de kan optages i bilag XIII. Forslag herom skal forelægges af en medlemsstat i form at et dossier (se bilag XIV).

Artikel 57 - Tildeling af godkendelser

Kommissionen er ansvarlig for tildeling og afvisning af godkendelser. Ansøgningen om godkendelse og afgørelsen vedrører ikke risici for menneskers sundhed og/eller miljøet som følge af emissioner af stoffet fra et anlæg, som har fået tildelt en tilladelse i henhold til direktiv 96/61/EF om integreret forebyggelse og bekæmpelse af forurening, eller fra en punktkilde underlagt kravet om forudgående regulering i henhold til vandrammedirektivet (direktiv 2000/60/EF), eller fra anvendelsen i medicinsk udstyr, da disse emissioner allerede på passende vis er omfattet af andre fællesskabsbestemmelser, der er gennemført i medlemsstaterne. Dette er således nødvendigt for at undgå at gribe ind i sådanne andre kompetenceområder og for at undgå forskelle mellem de afgørelser, der træffes under forskellige regelordninger, og for ikke at bruge ressourcer til at undersøge en indvirkning to gange.

Godkendelse udstedes, hvis risikoen for menneskers sundhed og miljøet i forbindelse med en anvendelse er styret på passende vis. I punkt 6 i bilag I findes en beskrivelse af begrebet tilfredsstillende kontrol. Hvis risikoen ikke anses for at være tilfredsstillende kontrolleret, kan der blive udstedt en godkendelse, hvis de samfundsøkonomiske fordele mere end opvejer risikoen for menneskers sundhed og miljøet, og hvis der findes passende alternative stoffer eller teknologier. I sådanne tilfælde analyseres alternativerne omhyggeligt. Hvis anvendelsen indebærer en stor risiko, og der findes et rimeligt alternativ (under hensyntagen til omkostninger, tilgængelighed og effektivitet), vil dette dog være et centralt element i overvejelserne i forbindelse med en afgørelse om godkendelse.

De tildelte godkendelser skal indeholde nærmere oplysninger om, hvem godkendelsen er givet til, om stoffet og den godkendte anvendelse samt om eventuelt gældende betingelser. Dette er vigtigt for indehaveren af godkendelsen og for hans downstream-brugere, som også skal følge betingelserne i godkendelsen. Godkendelser kan være underlagt frister for fornyet vurdering og/eller overvågningskrav. Der kan fastsættes frister for fornyet vurdering af godkendelser, f.eks. som følge af anvendelsen, den potentielle fremkomst af økonomiske erstatningsstoffer, eller stoffets type kan betyde, at det ikke vil være hensigtsmæssigt at tildele en tidsubegrænset godkendelse. Godkendelser tildelt ud fra samfundsøkonomiske hensyn er normalt tidsbegrænsede. Hvis en sådan godkendelse tildeles for et ubegrænset tidsrum, skal dette begrundes.

Afgørelser om godkendelser træffes efter at der er tages stilling til virkningerne på menneskers sundhed og miljøet af de virkninger, der betød, at stoffet i første omgang skulle godkendes (nærmere angivet i bilag XIII). Der skal ikke tages hensyn til andre virkninger, f.eks. brandfarlighed Hvis der er nødvendigt at indføre begrænsninger over for et stof, fordi der findes virkninger, der ikke medfører godkendelse, kan dette gøres gennem begrænsningsprocessen. Godkendelsesprocessen koncentrerer sig om et begrænset antal virkninger, fordi ressourcerne skal koncentreres om de meste problematiske virkninger og således gøre det muligt for systemet effektivt at behandle det størst mulige antal stoffer og anvendelser.

Artikel 58 - Fornyet vurdering af godkendelser

Det kan være nødvendigt at ændre eller tilbagetrække afgørelser om godkendelser som følge af en revidering, som kan finde sted på et hvilket som helst tidspunkt, hvor der sker en ændring af forholdene. Sådanne ændringer i forholdene kan f.eks. være ændringer i det videnskabelige grundlag for en afgørelse om godkendelse eller det at miljømæssige kvalitetsmål under direktivet om integreret forebyggelse og bekæmpelse af forurening eller

vandrammedirketivet ikke opfyldes som følge af emissioner fra diffuse kilder. Emissioner fra punktkilder hører imidlertid ind under disse direktiver.

Godkendelser kan derfor ændres, eller om nødvendigt tilbagetrækkes, hvis der fremkommer nye oplysninger, der sætter spørgsmålstegn ved den oprindelige godkendelse, under forudsætning af, at der fastsættes frister for den oprindelige ansøger til at ajourføre sin sag . Mens en revidering finder sted, har Kommissionen beføjelse til at suspendere godkendelsen i tilfælde af en alvorlig og umiddelbar risiko, under forudsætning af, at der tages hensyn til proportionaliteten.

Der indføres en strømlinet procedure for fornyelse af tidsbegrænsede godkendelser.

Artikel 59 - Ansøgninger om godkendelser

Enhver gruppering af stoffer, anvendelser og/eller ansøgere skal begrundes i ansøgningen. Den anvendelser, der ansøges om, kan være ansøgerens egne anvendelser, eller deres downstream-brugeres anvendelser. Mulighed for gruppering er indsat for at gøre godkendelsesprocessen så effektiv som muligt uden at reducere beskyttelsen samt for at give mulighed for at dele ansøgningsbyrden mellem flere ansøgere.

I de oplysninger, der ledsager en ansøgning, indgår en kemisk sikkerhedsrapport med nærmere oplysninger om den kemiske sikkerhedsvurdering. Vurderingen behøver kun omfatte de egenskaber, der medførte, at der blev krævet en godkendelse (angivet i bilag XIII: CMR, PBT, vPvB osv.). Hvis ansøgeren allerede har indsendt en registrering af stoffet, behøver han ikke igen indsende den kemiske sikkerhedsrapport, fordi man ved registreringen allerede har behandlet de risikostyringsforanstaltninger, der kræves for det pågældende stof og den pågældende anvendelse.

Under hensyntagen til betingelserne for tildeling af en godkendelse kan en ansøger indsende en samfundsøkonomisk analyse (socio-economic analysis - SEA), der redegør for konsekvenserne af henholdsvis en godkendelse og en afvisning i overensstemmelse med bilag XV, samt en analyse af alternativer og en substitutionsplan, hvis dette anses for hensigtsmæssigt. En afgørelse om godkendelse baseres på de oplysninger, som myndighederne har fået stillet til rådighed. Hvis en ansøgning om godkendelse afvises på grund af, at risici for menneskers sundhed og miljøet ikke er tilstrækkeligt styrede, og der ikke er indsendt en SEA, er "solnedgangsdatoen" stadig gældende. I dette tilfælde vil ansøgeren derfor skulle udarbejde en ny ansøgning om godkendelse af anvendelsen, herunder en SEA. Dette indebærer, at den pågældende anvendelse vil være forbudt indtil en godkendelse tildeles.

Artikel 60 - Efterfølgende ansøgninger om godkendelse

Denne bestemmelse gør det muligt ved en efterfølgende ansøgning om godkendelse at bruge den kemiske sikkerhedsrapport og, hvis dette er relevant, en samfundsøkonomisk analyse og foreliggende oplysninger om alternative stoffer eller præparater, der tidligere er indsendt, hvis den tidligere ansøger giver tilladelse hertil. Dette kan spare ressourcer hos ansøgeren og myndighederne ved at man ungår at gentage arbejde til ingen nytte.

Artikel 61 - Procedure for afgørelser om godkendelser

Denne artikel omhandler den procedure, der skal følges. Ansøgninger om godkendelser skal indgives til agenturet. Efter modtagelsen har agenturet 10 måneder til at udarbejde en udtalelse. Hvis ansøgeren har fået tilladelse til at henvise til en tidligere ansøgning om

godkendelse, nedsættes denne periode til 5 måneder. I udtalelsen tages hensyn til de oplysninger, som forelægges af ansøgeren, samt enhver form for andre foreliggende oplysninger. Fastsættelsen af frister giver industrien en vished, som den kan basere kommercielle beslutninger på, og det tilskynder også myndighederne til at nå frem til en afgørelse så hurtigt, som det med rimelighed er muligt.

Når en ansøgning modtages, offentliggøres der på agenturets websted ikke-fortrolige oplysninger om, hvilket stof og anvendelse(r), der ansøges om godkendelse for. På denne måde kan andre berørte parter gøre agenturet opmærksom på alternative stoffer eller processer, der kan være mindre skadelige for menneskers sundhed og miljøet. De oplysninger, der offentliggøres på webstedet må dog ikke være så detaljerede, at det giver andre adgang til følsomme oplysninger af kommerciel betydning.

Agenturet udarbejder to udtalelser. Den ene vedrører risiciene for menneskers sundhed og miljøet, og den anden de samfundsøkonomiske faktorer. Af hensyn til rimelighed og åbenhed har ansøgeren 2 måneder til at kommentere udtalelserne, hvis han ønsker at gøre dette, og agenturet har derefter yderligere 2 måneder til at ændre udkastet til udtalelse, hvis det mener, at dette bør gøres. Når udtalelsen er endelig, gøres den, for at fremme åbenheden, tilgængelig for Kommissionen, medlemsstaterne og ansøgeren, og de ikke-fortrolige dele af den offentliggøres på agenturets websted. Kommissionen vedtager derefter sin afgørelse om ansøgningen i henhold til rådgivningsproceduren.

Artikel 62 - Godekendelsesindehavernes forpligtelser

For at kunderne kan vide, om et stof kræver en godkendelse og er blevet tildelt en sådan, skal enhver mærkning af et stof på markedet til godkendt anvendelse (dette kan omfatte dets anvendelse i et præparat eller artikel) omfatte dets godkendelsesnummer. Downstream-brugeren kan således let kontrollere på agenturets websted, om han bruger stoffet på de betingelser, der er fastsat i godkendelsen.

Artikel 63 - Downstream-brugere

En downstream-bruger kan i henhold til artikel 54, stk. 2, anvende et stof på de betingelser, som indgår i en godkendelse tildelt en aktør længere oppe i forsyningskæden. I sådanne tilfælde underretter han agenturet, hvis han anvender stoffet til en sådan godkendt anvendelse. Dette skal ske for at sætte medlemsstaternes myndigheder i stand til at kontrollere, at de risici, som meget problematiske stoffer indebærer, styres på passende vis og/eller på betingelserne fastsat i en godkendelse.

2.8. Begrænsninger vedrørende fremstilling, markedsføring og anvendelse af visse farlige stoffer og præparater

Artikel 64 - Almindelige bestemmelser

Denne artikel angiver i generelle vendinger, at alle begrænsninger vedrørende stoffer, der er anført i bilag XVI og XVII, skal overholdes af alle, som fremstiller, anvender eller markedsfører disse stoffer. Opdelingen i to stykker skyldes, at begrænsningerne har forskellig baggrund: stk. 2 og bilag XVII omhandler begrænsninger, der udspringer af Stockholm-konventionen eller UNECE-protokollen om POP-stoffer (persistente organiske miljøgifte), dvs. af en bred international enighed, mens stk. 1 og bilag XVI omhandler alle andre begrænsninger.

Som udgangspunkt overføres begrænsningerne i direktiv 76/769/EØF, med senere ændringer, til bilag XVI i en omarbejdet form.

Begrænsningerne i bilag XVI finder ikke anvendelse på stoffer, der anvendes til videnskabelig forskning og udvikling og til produkt- og procesorienterede forskning- og udvikling, hvis disse stoffer anvendes i mængder på under 1 ton. Begrænsningerne i bilag XVII finder ikke anvendelse på stoffer, der anvendes til forskning på laboratorieniveau eller som referencestandard. Dette betyder, at undtagelserne er strammere end dem, der gælder stofferne i bilag XVI.

Begrænsningerne i bilag XVI eller XVII finder ikke anvendelse på stoffer, der er affald, og som myndighederne har givet tilladelse til at behandle i affaldsbehandlingsanlæg (f.eks. destruktion eller genvinding). Kravene vedrørende affald i Fællesskabets tidligere gennemførelse af Stockholm-konventionen og UNECE-protokollen finder også anvendelse, idet disse kan være mere restriktive.

Artikel 65 - Indførelse af nye og ændring af gældende begrænsninger

I denne artikel fastsættes de betingelser, der skal opfyldes for at et stof kan optages i bilag XVI og XVII, samt den procedure, der skal følges: forskriftsudvalget træffer direkte afgørelse om begrænsninger for stoffer, som opfylder kriterierne for kræftfremkaldende, mutagene og toksiske stoffer i kategori 1 og 2, og for hvilke Kommissionen foreslår begrænsninger for forbrugeranvendelse, samt for stoffer, for hvilke begrænsninger indgår i Stockholm-konventionen eller UNECE-protokollen. For alle andre begrænsninger skal processen i artikel 66 til 70 imidlertid følges. For de første to kategorier af stoffer er der allerede tilvejebragt en sundt videnskabeligt grundlag inden for klassifikationsproceduren eller under den internationale aftaleprocedure, mens artikel 66 til 70 sikrer, at et sådant videnskabeligt grundlag udarbejdes også for de andre begrænsninger. Der er også taget højde for at sikre en hensigtsmæssig grænseflade til direktivet om kosmetiske midler, idet REACH ikke bør anvendes som et redskab til at behandle spørgsmål, som kun er relevante for kosmetiske midler.

Artikel 66 - Udarbejdelse af et forslag

Denne artikel indeholder nærmere bestemmelser om, at enten medlemsstaterne eller Kommissionen - via agenturet - kan udarbejde forslag til begrænsninger, og om hvad der skal foretages for at de foreslåede begrænsninger kan behandles.

Forslag til begrænsninger skal baseres på en risikovurdering, der fastslår, hvorfor et tiltag på fællesskabsplan er påkrævet. For at bidrage til at sikre, at begrænsningsprocessen fungerer hurtigt - det tidligere system til indførelse af begrænsninger blev kritiseret for at være for langsomt - skal risikovurderingerne udføres i overensstemmelse med visse krav, der er beskrevet i bilag XIV. Hvis en medlemsstats risikovurdering efter agenturets opfattelse ikke opfylder disse krav, vil forslaget til begrænsninger ikke blive viderebehandlet, før sådanne mangler er blevet afhjulpet.

For at opnå konsistens i EU-lovgivningen skal både medlemsstaterne og agenturet tage hensyn til enhver risikovurdering af stoffet, der har fundet sted i henhold til anden EU-lovgivning.

For at bidrage til at sikre åbenhed i processen og sikre, at alle med en interesse i en foreslået begrænsning har mulighed for at fremkomme med relevante oplysninger til brug i

beslutningsprocessen, offentliggøres alle risikovurderinger, der opfylder kravene i bilag XVI, på agenturets websted. Alle berørte parter opfordres til både at kommentere risikovurderingen og til at fremkomme med oplysninger om de samfundsøkonomiske konsekvenser af de foreslåede begrænsninger.

Artikel 67 - Agenturets udtalelse: Udvalg for risikovurdering

Denne artikel indeholder nærmere bestemmelser, som skal følges i agenturet ved udarbejdelse af en udtalelse om den risikovurdering, som de foreslåede begrænsninger er baseret på, og om eventuelt fremsendte kommentarer.

Der er fastsat frister for at sikre, at processen afvikles så hurtigt som muligt under hensyntagen til behovet for nøjagtighed, rimelighed og en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet.

Udtalelsen udarbejdes af rapportør for risikovurdering og vedtages af udvalget for risikovurdering. Dette sker for at sikre, at den ekspertise, der er til rådighed i agenturet på det pågældende område i fuld omfang får indflydelse på udtalelsen.

Artikel 68 - Agenturets udtalelse: Udvalg for samfundsøkonomisk analyse

Denne artikel indeholder nærmere bestemmelser, som skal følges i agenturet ved udarbejdelse af en udtalelse om de samfundsøkonomiske konsekvenser af de foreslåede begrænsninger.

Der er fastsat frister for at sikre, at processen afvikles så hurtigt som muligt under hensyntagen til behovet for nøjagtighed, rimelighed og en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet. Fristen er længere end fristen for udvalget for risikovurdering, således at der kan tages hensyn til dette udvalgs udtalelse.

Udtalelsen udarbejdes af en rapportør for samfundsøkonomisk analyse og vedtages af udvalget for samfundsøkonomisk analyse. Dette sker for at sikre, at den ekspertise, der er til rådighed i agenturet med hensyn til samfundsøkonomisk analyse, i fuld omfang får indflydelse på udtalelsen.

Det erkendes, at mange berørte parter enten ikke har de nødvendige ressourcer eller de nødvendige oplysninger til at udarbejde en komplet samfundsøkonomisk analyse. Derfor kan oplysninger, der kan bidrage til en sådan analyse, også fremsendes for at indgå i udvalgets og rapportørens overvejelser.

Artikel 69 - Fremsendelse af en udtalelse til Kommissionen

I henhold til denne artikel skal agenturet fremsende de to udvalgs udtalelser samt støttemateriale, hvis det er påkrævet, til Kommissionen, således at denne kan udarbejde et forslag på grundlag af komplet information og ekspertudtalelserne fra agenturets to udvalg.

I henhold til denne artikel skal agenturet også underrette Kommissionen, hvis det ene eller begge udvalgene, ikke har udarbejdet en udtalelse inden for de frister, der er fastsat i artikel 67 og 68.

For skabe åbenhed offentliggøres udtalelserne på agenturets websted.

Artikel 70 - Kommissionens afgørelse

I henhold til denne artikel skal Kommissionen udarbejde forslag til en ændring af eller en tilføjelse til bilag XVI inden for en frist på 3 måneder efter modtagelse af de to udtalelser fra agenturets to udvalg, eller 3 måneder efter fristerne i artikel 67 og 68, hvis der ikke er afgivet udtalelser.

Denne frist er fastsat for at bidrage til at sikre, at forslag om begrænsninger fremsættes så hurtigt som det er muligt under hensyntagen til behovet for nøjagtighed, rimelighed og en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet.

Det er Kommissionens ansvar at tage stilling til dokumentationen fra agenturets to udvalg samt deres udtalelser. Kommissionen afvejer den fremlagte dokumentationen og fremsætter et forslag. Kommissionen kan undtagelsesvis fremsætte et forslag, der hverken er i overensstemmelse det ene eller det andet udvalgs udtalelse. Hvis dette er tilfældet, giver Kommissionen en detaljeret forklaring af forslaget og grundene til, at det afviger fra de to udvalgs udtalelser.

2.9. Agenturet

Artikel 71 - Oprettelse af agenturet og dettes ansvarsområde

Med denne artikel oprettes Det Europæiske Kemikalieagentur, som vil bidrage til en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet inden for rammerne af det indre marked. Agenturet er ansvarligt for at sikre, at det på tilfredsstillende vis opfylder de opgaver, som det pålægges ved denne forordning, og for at koordinere de kompetente medlemstats-myndigheders ressourcer under REACH-systemet. Denne koordineringsrolle er, i modsætning til at give agenturet en rolle som regulerende organ for hele EU, en rolle, der er i overensstemmelse med subsidiaritetsprincippet.

Artikel 72 - Agenturets opbygning

I denne artikel fastlægges agenturets struktur:

– bestyrelsen

– den administrerende direktør

– udvalget for risikovurdering, som udarbejder agenturets udtalelser vedrørende risici for menneskers sundhed og miljøet under godkendelses- og begrænsningsprocedurerne

– udvalget for samfundsøkonomisk analyse, som udarbejder agenturets udtalelser vedrørende alle spørgsmål med relation til den samfundsøkonomiske analyse af stoffer

– medlemsstatsudvalget, der koordinerer arbejdet med vurdering, klassificering og etikettering samt identifikation af meget problematiske stoffer

– forummet til udveksling af oplysninger om håndhævelse, som koordinerer et net af håndhævende myndigheder i medlemsstaterne, men ikke udarbejder udtalelser fra agenturet

– sekretariatet til støtte for udvalgene og forummet samt til udførelse af de administrative dele af REACH-systemet og

– appeludvalget, der behandler eventuelle indsigelser mod agenturets afgørelser.

De beskrives nærmere nedenfor.

I stk. 2 gives udvalgene og forummet mulighed for at nedsætte arbejdsgrupper. Disse kan f.eks. bruges til at forberede et udvalgs arbejde i forbindelse med en bestemt procedure, som f.eks. begrænsningsproceduren, eller til at behandle bestemte tekniske spørgsmål.

Udvalget for risikovurdering har forskellige, men relaterede, arbejdsopgaver under begrænsnings- og godkendelsesprocedurerne. Det kunne være hensigtsmæssigt at oprette arbejdsgrupper for hver af disse, mens udvalget sørger for kohærensen i arbejdet i de enkelte arbejdsgrupper.

Stk. 3 giver udvalgene og forummet muligheder for i nødvendigt omfang at indhente rådgivning fra hensigtsmæssige eksterne kilder.

Artikel 73 - Agenturets arbejdsopgaver

I henhold til denne artikel skal agenturet rådgive medlemsstaterne og Fællesskabet i forbindelse med REACH-systemet.

Stk. 2 omhandler de arbejdsopgaver, der skal udføres af sekretariatet uden udvalgenes medvirkning. Der er i det væsentligste tale om administrative arbejdsopgaver, der kræver en god indsigt i REACH-systemet, men kun begrænset teknisk ekspertise, og det ville derfor være uhensigtsmæssigt at inddrage udvalgene. Arbejdsopgaverne (a)-(c) indebærer spredning af oplysninger til medlemsstaterne og andre berørte parter. Arbejdsopgave (d) går ud på at oprette og vedligeholde den database, der er den primære informationskilde, der vil være til rådighed for de kompetente myndigheder, samt den kilde af ikke-fortrolige oplysninger, der kan stilles til rådighed på anmodning. I henhold til arbejdsopgave (e) skal agenturet gøre oplysninger om, hvilke stoffer der er blevet vurderet eller er under vurdering, offentligt tilgængelige. Arbejdsopgave (f) omfatter udarbejdelse af dokumenter til virksomheder vedrørende deres forpligtelser under REACH-systemet. Da disse dokumenter ikke forventes at være særlig tekniske, er det hensigtsmæssigt at overdrage denne arbejdsopgave til sekretariatet. Arbejdsopgave (g) er oprettelsen af en help desk til støtte for medlemsstaternes kompetente myndigheders egne help desks. Medlemsstaternes kompetente myndigheders help desks hjælper med rådgivning til virksomheder, og agenturets help desk søger at fremme en harmoniseret fremgangsmåde blandt medlemsstaternes kompetente myndigheder. Agenturets help desk rådgiver ikke industrien direkte, fordi det at kunne råde over den sprogkapacitet og det kendskab til lokale forhold, der er nødvendigt for at kunne besvare mange tusinde potentielle forespørgsler i et udvidet EU, ville kræve en uforholdsmæssig stor investering af ressourcer. Arbejdsopgave (h) omfatter udarbejdelse af beskrivende dokumenter, der skal hjælpe interessenter uden for industrien til at forstå REACH-systemet.

Stk. 3 omhandler de arbejdsopgaver, der skal udføres af udvalgene. Arbejdsopgave (a) til (e) er arbejdet inden for de relevante procedurer, der fører til vedtagelse af udtalelser eller anbefalinger for stoffer, der skal med i første trin af godkendelsen eller klassificeres på fællesskabsplan. Arbejdsopgave (f) består i teknisk støtte til Fællesskabets deltagelse i internationale harmoniseringsaktiviteter, idet agenturets ekspertise gør det til det naturlige

kontaktpunkt i sådant arbejde. Arbejdsopgave (g) giver Kommissionen ret til at anmode om ad hoc-udtalelser om bestemte spørgsmål vedrørende stoffers sikkerhed.

Stk. 4 omhandler forummets arbejde. Dette er i høj grad baseret på arbejdet i det nuværende uformelle netværk af medlemsstaternes kompetente myndigheder. Arbejdsopgaverne kræver i vid udstrækning ingen forklaring. Forummets arbejde vil blive udført af medlemsstaternes repræsentanter med administrativ og logistisk bistand fra agenturet. Agenturet selv får en overvågningsrolle med hensyn til håndhævelse. Det forventes, at forummet vil komme til at spille en vigtig rolle med hensyn til at sikre, at REACH-systemet kommer til at fungere effektivt.

I stk. 5 bestemmes det, at appeludvalget skal træffe afgørelse i tilfælde af indsigelser mod en afgørelse fra agenturets side.

Artikel 74 - Bestyrelsens beføjelser

I denne artikel fastlægges bestyrelsens beføjelser i overensstemmelse med principperne i Kommissionens meddelelse om rammerne for europæiske reguleringsorganer.

Artikel 75 - Bestyrelsens sammensætning

I denne artikel fastlægges bestyrelsens sammensætning i overensstemmelse med principperne i Kommissionens meddelelse om rammerne for europæiske reguleringsorganer.

Artikel 76 - Formandskab for Bestyrelsen

Artikel 77 - Møder

Artikel 78 - Afstemning

Disse artikler kræver ikke nærmere forklaring.

Artikel 79 - Den administrerende direktørs opgaver og beføjelser

I denne artikel fastlægges den administrerende direktørs beføjelser i overensstemmelse med principperne i Kommissionens meddelelse om rammerne for europæiske reguleringsorganer.

De arbejdsopgaver, der er opstillet i stk. 2, kræver generelt ingen nærmere forklaring, men der er dog et par punkter, der fortjener at blive kommenteret. Arbejdsopgave (c) indebærer, at den administrerende direktør nøje skal følge udvalgenes arbejde for at sikre, at de overholder de frister, der er fastsat i lovgivningen. Den tidsmæssige koordinering af udvalgenes arbejde under arbejdsopgave (e) kræver især, at udvalget for risikovurdering i tide leverer information til udvalget for samfundsøkonomisk analyse, og at sidstnævnte udvalg derefter i tide giver feedback til førstnævnte udvalg.

Arbejdsopgaverne i stk. 3 vedrører årlige aktiviteter med hensyn til rapportering, arbejdets tilrettelæggelse, regnskabsføring og budgetoverslag.

Artikel 80 - Udnævnelse af den administrerende direktør.

Denne artikel indeholder bestemmelser om en gennemskuelig procedure for udvælgelse og udnævnelse af en egnet kandidat.

Artikel 81 - Oprettelse af udvalgene

I henhold til denne artikel kan hver medlemsstat udpege kandidater til udvalget for risikovurdering og udvalget for samfundsøkonomisk analyse. Bestyrelsen udnævner mindst 1 medlem fra hver medlemsstat, der har udpeget en kandidat til det pågældende udvalg. Medlemsstaterne udnævner hver 1 medlem til medlemsstatsudvalget. Medlemmerne skal være i besiddelse af teknisk ekspertise med relevans for det udvalg, som de skal sidde i. Det er hensigten, at medlemmerne af udvalget for risikovurdering og udvalget for samfundsøkonomisk analyse skal afgive deres synspunkter som eksperter og ikke som repræsentanter for deres medlemsstater. Det er dog hensigtsmæssigt at hente medlemmerne fra medlemsstaterne, fordi dette vil give udvalgene adgang til medlemsstaternes kollektive ekspertise, fremme gensidig accept af afgørelserne og støtte harmoniseringen af reguleringspraksis i hele Fællesskabet.

For at opnå en god dækning af ekspertise i hvert af udvalgene kan disse ved selvsupplering indvælge indtil fem medlemmer mere. I erkendelse af, at udvalgsmedlemmer ikke kan have den fornødne ekspertise til at behandle alle sager, der måtte blive forelagt et udvalg, kan medlemmerne lade sig ledsage af videnskabelige og tekniske rådgivere, der besidder den relevante ekspertise inden for det pågældende emne. Kommissionen og agenturets administrerende direktør har adgang til udvalgsmøderne.

Udvalgsmedlemmer skal sikre en passende koordinering af arbejdet i de kompetente myndigheder i medlemsstaterne og arbejdet i deres udvalg med henblik på at fremme en fælles europæisk approach. I denne sammenhæng er det nyttigt at bemærke, at medlemmerne af tilsvarende udvalg under EMEA bruger ca. en fjerdedel af deres tid på agenturet og resten af tiden i deres medlemsstater. Det forventes, at udvalgsmedlemmerne vil komme til at tilbringe mindst en tilsvarende del af deres tid på agenturet.

Medlemsstaterne skal yde videnskabelig og teknisk støtte til arbejdet i udvalgene og arbejdsgrupperne. Dette er agenturets vigtigste middel til at koordinere de videnskabelige og tekniske ressourcer, som det får stillet til rådighed af medlemsstaterne, således som det kræves i henhold til artikel 71. Medlemsstaterne må ikke give medlemmer af udvalget for risikovurdering og udvalget for samfundsøkonomisk analyse instrukser, der kan være i modstrid med en objektiv videnskabelig og teknisk analyse af de spørgsmål, der behandles.

For at lette udvalgenes arbejde kan afgørelser vedtages af et flertal af udvalgsmedlemmerne, idet mindretallets synspunkter føres til protokol.

Artikel 82 - Oprettelse af forummet

I henhold til denne artikel skal hver medlemsstat udpege et medlem til forummet. Medlemmerne skal være i besiddelse af ekspertise, der er relevant for forummet. Det er hensigten, at medlemmerne skal afgive deres synspunkter som eksperter og ikke som repræsentanter for deres medlemsstater. For at opnå en god dækning af ekspertise i forummet kan dette ved selvsupplering indvælge indtil fem medlemmer mere. I erkendelse af, at forummets medlemmer ikke kan have den fornødne ekspertise til at behandle alle sager, som det måtte blive forelagt, kan medlemmerne lade sig ledsage af videnskabelige og tekniske rådgivere, der besidder den relevante ekspertise inden for det pågældende emne.

Medlemmerne af forummet skal sikre en passende koordinering af arbejdet i de kompetente myndigheder i medlemsstaterne og arbejdet i forummet med henblik på at fremme en fælles europæisk approach med hensyn til håndhævelse og for at sikre, at praktiske erfaringer indgår i forummets arbejde.

I henhold til stk. 3 er dette agenturets vigtigste middel til at koordinere de videnskabelige og tekniske ressourcer, som det får stillet til rådighed af medlemsstaterne (især af de kompetente myndigheder), således som det kræves i henhold til artikel 71. Medlemsstaterne skal yde videnskabelig og teknisk støtte til arbejdet i forummet og dets arbejdsgrupper. De må ikke give medlemmerne af forummet instrukser, der kan være i modstrid med en objektiv videnskabelig og teknisk analyse af de spørgsmål, der behandles. De skal også holde øje med kvaliteten og uafhængigheden af arbejdet i forummet og dets arbejdsgrupper, for at sikre, at alle medlemmer udfører deres rolle på passende vis.

Artikel 83 - Udvalgenes rapportører og brug af eksperter

Hvis der kræves en afgørelse fra et udvalg i henhold til vurderings-, begrænsnings- eller godkendelsesproceduren, kan der udpeges en rapportør. Et udvalg kan også udpege en medrapportør. Dette kan vise sig særdeles nyttigt, hvis medrapportøren har bedre adgang til ekspertise, f.eks. i hans medlemsstats kompetente myndighed, vedrørende et særligt aspekt af en sag.

Udvalgene skal i deres forretningsorden udarbejde nærmere bestemmelser om, hvorledes en rapportør eller medrapportør suppleres.

Stk. 3 indeholder bestemmelser om kontrakter til betaling af rapportører, ikke-statslige eksperter i arbejdsgrupper og andre eksperter, der udfører andre opgaver for agenturet. Den administrerende direktør er ansvarlig for forvaltningen af sådanne kontrakter. I denne sammenhæng skal det bemærkes, at en rapportør ikke forventes af arbejde alene, men snarere at koordinere arbejdet i et team af eksperter, der udarbejder rapporten for udvalget.

Stk. 4 indeholder bestemmelser om indkaldelse af interessetilkendegivelser, når dette er hensigtsmæssigt. Det forventes ikke at være hensigtsmæssigt i forbindelse med rapportører.

Med stk. 5 gives agenturet mulighed for at hyre eksperter til udførelse af andre specifikke arbejdsopgaver. Dette kunne f.eks. være, når Kommissionen anmoder om ad hoc-udtalelser om bestemte emner, som der er truffet bestemmelser om i artikel 73, stk. 3, litra f).

Artikel 84 - Medlemmer af udvalg og bestyrelse - kvalifikationer og interesseforhold

Af hensyn til åbenheden bør navnene på udvalgsmedlemmerne samt deres kvalifikationer offentliggøres. Medlemmerne kan anmode om, at deres identitet ikke offentliggøres, hvis de er bekymrede for deres personlige sikkerhed. Dette er et problem i visse medlemsstater i forbindelse med spørgsmål om dyrebeskyttelse.

For at sikre en objektiv rådgivning, skal de, der udnævnes til agenturet, afgive erklæringer om deres interesseforhold, og de må ikke deltage i drøftelser eller afstemninger om spørgsmål, hvor deres interesser berøres.

Artikel 85 - Oprettelse af appeludvalget

Denne artikel omhandler medlemmerne af appeludvalget, hvordan de udnævnes og deres stemmerettigheder.

Artikel 86 - Medlemmer af appeludvalget

I denne artikel fastsættes mandatperioden for medlemmerne af appeludvalget, hvem der kan være medlemmer, under hvilke betingelser de kan afsættes, og hvorledes potentielle interessekonflikter skal løses.

Artikel 87 - Afgørelser, der kan appelleres

I denne artikel forklares det, at der kan appelleres mod afgørelser:

– om afvisning af en registrering

– om tildeling, afvisning eller fastsættelse af betingelser for en ansøgning om fritagelse for stoffer, der anvendes til produkt- og procesorienteret forskning og udvikling

– truffet i henhold vurderingsbestemmelserne

– om accept eller afvisning af en erklæring om, at oplysninger skal holdes fortrolige, og

– om afvisning af adgang til oplysninger.

Enhver afgørelse, som appelleres, er ikke gældende før appellen er behandlet.

Artikel 88 - Hvem kan appellere? - frister og form

I denne artikel fastsættes, at den person, som en afgørelse er henvendt til, har 1 måned til at gøre indsigelser mod afgørelsen.

Artikel 89 - Behandling og afgørelse af appelsager

Afgørelser vedrørende appelsager skal træffes inden for en frist på 30 dage. De involverede i en appelsag, er berettiget til at forelægge deres sag for bestyrelsen.

Artikel 90 - Indbringelse af sager for Domstolen

Appeludvalgets afgørelser, samt sager mod agenturet for ikke at træffe afgørelse, kan indbringes for Domstolen. Agenturet skal rette sig efter Domstolens dom.

Artikel 91 - Klager til den europæiske ombudsmand

Denne artikel er nødvendig for at bringe bestemmelserne om agenturet i overensstemmelse med artikel 195 i EF-traktaten.

Artikel 92 - Afvigende udtalelser i forhold til andre organer

Andre organer, især EMEA (Det Europæiske Agentur for Lægemiddelvurdering) og EFSA (Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet) har ansvarsområder med relation til agenturets ansvarsområder. Man kan forestille sig, at disse andre organer kan vedtage udtalelser om

visse stoffer, der er forskellige fra agenturets udtalelser. I denne artikel fastlægges derfor en mekanisme til behandling af sådanne forskelle. Ligeledes findes der videnskabelige fællesskabsudvalg, der kan blive anmodet om at afgive udtalelser, der vedrører stoffer, og denne mekanisme gælder derfor også for dem. Relationerne mellem medlemsstaternes kompetente myndigheder og agenturet er udførligt behandlet i REACH-systemet, og det ville derfor ikke være hensigtsmæssigt at lade denne mekanisme gælde for dem. Relevante nationale organer i de enkelte medlemsstater er heller ikke omfattet, idet medlemsstaternes kompetente myndigheder forventes at tage hensyn til sådanne organers synspunkter ved udarbejdelse af deres egne synspunkter.

Artikel 93 - Agenturets budget

Denne artikel indeholder bestemmelser om udarbejdelse af budgettet for dette fællesskabsagentur. Budgettet finansieres gennem et fællesskabstilskud, gennem gebyrer for registrering og godkendelse og gennem frivillige bidrag fra medlemsstaterne. For alle stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på 100 tons og derover, skal der foretages en vurdering, og derfor kræves der et større gebyr for registrering af sådanne stoffer for at finansiere arbejdet med vurderinger. Andre stoffer kan gennemgå en vurdering på myndighedernes initiativ, men det ville ikke være rimeligt at afkræve industrien et gebyr for dette. Det ville ligeledes være urimeligt at opkræve et gebyr, når der indledes en begrænsningsprocedure. Disse og andre af agenturets aktiviteter vil blive finansieret over en almindelig reserve, der tages fra det grundlæggende registreringsgebyr og tilskuddet fra Fællesskabets budget.

Kommissionen foreslår, at Fællesskabets tilskud i løbet af nogle år bringes på linje med omkostningerne til støtte af Det Europæiske Kemikaliekontor over Fællesskabets budget i henhold til nugældende lovgivning. Det er vigtigt at bemærke, at Fællesskabets tilskud vil variere betydeligt i de 10 første år af agenturets eksistens, hvor stoffer indfases i systemet. Dette er fordi registreringsfristerne for indfasningsstoffer vil betyde, at der i visse år vil være meget store indtægter fra gebyrer, mens der i andre vil være relativt små indtægter.

Artikel 94 - Gennemførelse af agenturets budget

Denne artikel indeholder bestemmelserne vedrørende udarbejdelse af budgettet for dette fællesskabsagentur.

Artikel 95 - Gebyrer

Denne artikel giver bestyrelsen beføjelser til at fastsætte og justere de gebyrer, der skal betales af industrien for at finansiere agenturets arbejde. Dette vil hjælpe agenturet til at få balance i budgettet, efterhånden som der opnås erfaringer med REACH-systemets drift. På denne måde kan de omkostninger, som agenturet pådrager sig, i forbindelse med forordningens forskellige dele, komme til udtryk i gebyrstrukturen.

Artikel 96 - Bekæmpelse af svig

Denne artikel indeholder standardbestemmelser vedrørende bekæmpelse af svig.

Artikel 97 - Finansforordning

Denne artikel omfatter standardbestemmelser vedrørende vedtagelse af agenturets finansforordning.

Artikel 98 - Agenturets retlige status og hjemsted

Med denne artikel gøres agenturet til en juridisk person, hvilket sætter det i stand til at købe og sælge ejendom, indlede retssager osv.

I henhold til den nuværende kemikalielovgivning opfylder Det Europæiske Kemikaliekontor under Kommissionens Fælles Forskningscenter en rolle, der er analog med agenturets rolle. Det skal fungere som centrum for Kommissionen detaljerede forberedende arbejde forud for REACH-systemet, og i perioden lige efter REACH-systemets ikrafttræden, skal det midlertidigt opfylde agenturets rolle. I betragtning af den store betydning af kontinuiteten i kemikaliereguleringen og agenturets behov for hurtigt at ansætte en kærne af erfarne medarbejdere forslår Kommissionen, at agenturet får sæde samme sted som det nuværende Europæiske Kemikaliekontor.

Artikel 99 - Agenturets erstatningsansvar

Denne artikel omfatter standardbestemmelser vedrørende agenturets erstatningsansvar og giver Domstolen kompetence til at træffe afgørelser i tvister eller mægling. For så vidt angår de ansattes ansvar over for agenturet henvises til artikel 101.

Artikel 100 - Agenturets privilegier og immuniteter

Med denne artikel gives agenturet de samme privilegier og immuniteter, som gælder for De Europæiske Fællesskaber.

Artikel 101 - Personalevedtægt

I henhold til denne artikel underlægges agenturets personale de regler og forskrifter, der gælder for tjenestemænd og øvrige ansatte ved De Europæiske Fællesskaber, og agenturet gøres til ansættelsesmyndighed i personalevedtægtens betydning. Bestyrelsen beføjes til at vedtage de nødvendige gennemførelsesbestemmelser i samråd med Kommissionen.

Artikel 102 - Fortrolighed

Med denne artikel pålægges de ansatte i agenturet en normal fortrolighedspligt.

Artikel 103 - Tredjelandes deltagelse

I henhold til denne artikel gives tredjelande mulighed for at deltage i agenturets arbejde. De kan deltage i det omfang, som agenturet anser for passende for et bestemt land på et bestemt tidspunkt. Dette kan f.eks. være nyttigt, når kandidatlande skal forberedes til deres fremtidige rolle som medlemsstater, eller til at fremme samarbejdet med medlemmerne af Det Europæiske Økonomiske Samarbejdsområde.

Artikel 104 - International regelharmonisering

I denne artikel gives internationale organisationer, der har interesse i harmoniseringen af internationale regler, mulighed for at deltage som observatører i agenturets arbejde. Målet er at skabe et fokuspunkt for Fællesskabets input til sådanne aktiviteter. Agenturet aftaler betingelserne for sådan deltagelse.

Artikel 105 - Kontakt med interessent-organisationer

I denne artikel gives der mulighed for at involvere industrien, og organisationer, der arbejder med forbrugerbeskyttelse, beskyttelse af arbejdstagerne eller miljøbeskyttelse, i agenturets arbejde. Formålet er at fremme åbenhed og således sikre en udbredt accept af arbejdet blandt de vigtigste interessenter.

Artikel 106 - Regler om åbenhed

I denne artikel fastlægges regler, der skal sikre, at agenturet arbejder med den nødvendige åbenhed. Disse regler skal godkendes af agenturet og Kommissionen.

Artikel 107 - Relationer til relevante Fællesskabsorganer

I henhold til denne artikel må der ikke være kompetenceoverlapning mellem agenturet og Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet, Det Europæiske Agentur for Lægemiddelvurdering eller Det Rådgivende Udvalg for Sikkerhed og Sundhed på Arbejdspladsen. Med henblik på at sikre et effektivt samarbejde med Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet om stoffer, der benyttes i plantebeskyttelsesmidler, skal den administrerende direktør udarbejde regler for en samarbejdsprocedure. Der er også et behov for samarbejde med Det Rådgivende Udvalg om spørgsmål vedrørende beskyttelse af arbejdstagerne, og også her skal den administrerende direktør udarbejde regler for en samarbejdsprocedure.

Kommissionen og agenturet skal overveje muligheden for at udveksle personale for at fremme forståelsen af deres respektive roller under denne forordning.

Artikel 108 - Formater og software til indsendelse af oplysninger til agenturet

For at bidrage til at få REACH-systemet til at fungere effektivt og for at hjælpe aktørerne i forsyningskæden med at opfylde deres forpligtelser i henhold til REACH-systemet, vil der på Internet være gratis adgang til standardformater til indsendelse af oplysninger samt til software-pakker.

2.10. Fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer

Artikel 109 - Anvendelsesområde

I denne artikel angives det, hvad dette afsnit gælder for.

Artikel 110 - Forpligtelse til at underrette agenturet

I denne artikel angives det, hvilke oplysninger, der skal indsendes af alle, som markedsfører et stof. Da forpligtelsen til at klassificere og etikettere allerede gælder for alle stoffer, der markedsføres, vil sådanne oplysninger blive krævet fra den første indfasningsfrist (tre år efter forordningens ikrafttrædelse). Data vedrørende klassificering og etikettering indgår i de normale oplysningskrav ved registrering. Hvis der allerede en indsendt en registrering, er der ingen grund til at meddele oplysningerne igen. Hvis der senere fremkommer yderligere oplysninger som et resultat af REACH-systemet eller på anden måde, skal indførslen i fortegnelsen opdateres. Det forventes, at de anmeldte eller registrerede klassificeringer vil være indbyrdes afvigende for nogle stoffer. Med tiden forventes det, at anmelderne og registranterne vil samarbejde for at nå til enighed om de oplysninger, som skal indføres.

Artikel 111 - Fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer

I denne artikel gives nærmere oplysninger om de informationer, der skal indgå i fortegnelsen. Fortegnelsen vil blive gjort bredt tilgængelig som en informationskilde om stoffer, og den skal også tjene til at anspore industrien til at harmonisere dens klassificerings- og etiketteringsforslag, når oplysninger om det samme stof afviger fra hinanden.

Artikel 112 - Harmonisering af klassificering og etikettering

I denne artikel specificeres det, at når forordningen træder i kraft, er det kun stoffer, der har en eller flere bestemte farlige egenskaber, der kan tilføjes bilag I til direktiv 67/548/EØF. Formålet med dette krav er at koncentrere ressourcerne om klassificeringen af de stoffer, som har meget problematiske egenskaber. Mindre problematiske egenskaber dækkes på passende vis af de andre bestemmelser i forordningen.

Artikel 113 - Overgangsordninger

Alle stoffer, der markedsføres, er underlagt krav om klassificering og etikettering. Anmeldelser til agenturet til optagelse i fortegnelsen over klassificeringer og etiketteringer kan derfor finde sted ret hurtigt, nemlig på datoen for den første indfasningsfrist.

2.11. Oplysninger

Artikel 114 - Rapportering

Med forordningen indføres et nyt og omfattende system til forvaltning af industrielle kemikalier. Det er derfor nødvendigt, at både medlemsstaterne, agenturet og Kommissionen holder øje med, hvordan det fungerer, således at eventuelle problemer kan identificeres. Der er derfor behov for, at alle medlemsstater, agenturet og Kommissionen rapporterer om alle aspekter af forordningen og om, hvordan de fungerer.

Artikel 115 - Adgang til oplysninger

Et af målene med det nye system er i langt højere grad at gøre adgangen til oplysninger om kemikalier bredt tilgængelig. Med disse bestemmelser oprettes Det Europæiske Kemikalieagentur (agenturet), der skal styre de tekniske, videnskabelige og administrative aspekter af REACH-systemet og sikre konsekvens i beslutningstagningen på fællesskabsniveau. Agenturet giver i henhold til forordning (EF) nr. 1049/2001 efter anmodning adgang til visse ikke-fortrolige oplysninger, men når en sådan anmodning om adgang fremsættes, kan en tredjepart, der er berørt af oplysningerne, indsende en erklæring med anmodning om, at oplysningerne holdes fortrolige. For at dette kan ske skal han godtgøre, at frigivelse af oplysningerne rent faktisk ville kunne skade ham kommercielt. Der er fastlagt passende procedurer herfor. Direktiv 2003/4/EF finder anvendelse på anmodninger om at modtage oplysninger fra de kompetente myndigheder i medlemsstaterne, men hvis de pågældende data stammer fra agenturet, er det agenturet, der beslutter, om der kan gives adgang til dem.

Artikel 116 - Fortrolighed

I denne artikel fastlægges, hvilke informationer, der ikke skal behandles som fortrolige, og som derfor gøres tilgængelige i databasen, og hvilke der automatisk skal behandles som fortrolige, og som derfor ikke gøres tilgængelige. Alle andre oplysninger kan påberåbes at være fortrolige i henhold til artikel 115, stk. 2, hvis det kan påvises, at frigivelse af oplysningerne ville kunne være kommercielt til skade for den berørte part. De

minimumsoplysninger, der er nødvendige for på passende vis at kunne kontrollere et stof, må ikke holdes fortrolige, herunder heller ikke grundlæggende oplysninger om de farer, som et stof indebærer, vejledning i sikker anvendelse, de oplysninger i sikkerhedsdatabladet, der ikke anses for at være fortrolige, samt oplysninger til identifikation af stoffet.

Artikel 117 - Samarbejde med tredjelande og internationale organisationer

Denne artikel giver mulighed for at data i agenturet, under passende fortrolighedsforanstaltninger, kan udveksles med tredjelande eller internationale organisationer, der udfører opgaver i henhold til en lovgivning i lighed med REACH. Dette sker for at undgå dobbeltarbejde på internationalt plan og for at udveksle erfaringer. Enhver sådan ordning skal være i overensstemmelse med EF-traktaten.

2.12. Kompetente myndigheder

Artikel 118 - Udpegelse af kompetente myndigheder

For at sikre, at de kompetente myndigheder er i stand til at opfylde de forpligtelser, de er blevet tildelt under REACH-systemet, kræves det i denne artikel, at medlemsstaterne opretter sådanne myndigheder og tildeler dem tilstrækkelige ressourcer til, at de kan udføre deres forpligtelser.

Artikel 119 - Samarbejde mellem kompetente myndigheder

Et samarbejde mellem de kompetente myndigheder er vigtig for, at REACH-systemet kommer til at fungere godt.

Artikel 120 - Formidling af oplysninger til offentligheden om stoffers risici

I visse tilfælde kan videreformidling af oplysninger til offentligheden udgøre den mest hensigtsmæssige risikostyringsforanstaltning. De kompetente myndigheder i medlemsstaterne er, som følge af betydningen af de kulturelle og sproglige elementer i en vellykket oplysningskampagne, bedre end agenturet i stand til at formidle sådanne oplysninger.

Artikel 121 - Andre ansvarsområder, som påhviler de kompetente myndigheder

I betragtning af, at REACH-systemet pålægger industrien en række nye forpligtelser, er det vigtigt, at virksomhederne, især de små og mellemstore virksomheder, ved, hvor de kan henvende sig for at få rådgivning. Der er mange kompetente myndigheder, der allerede rådgiver industrien, men i denne artikel gøres dette krav formelt. Det forventes, at de kompetente myndigheder vil oprette help-deske med passende oplysninger online. Det er hensigtsmæssigt at overdrage denne opgave til de kompetente myndigheder i stedet for til agenturet, fordi de har den sproglige kompetence og det kendskab til lokale forhold, der er nødvendigt for effektivt at kunne besvare henvendelser.

2.13. Håndhævelse

Artikel 122 - Medlemsstaternes opgaver

I henhold til denne artikel skal medlemsstaterne indføre passende fremgangsmåder til håndhævelse af forordningens bestemmelser. Erfaringerne med Cleen (Chemical Legislation European Enforcement Network) med aktiviteter, der går ud på at følge håndhævelsen af forskellige dele af kemikalielovgivningen i en række medlemsstater, vil udgøre en værdifuld

ressource ved udarbejdelsen af sådanne fremgangsmåder. Det forum, der skal oprettes i forbindelse med agenturet vil videreføre Cleen's arbejde ved at udvikle en konsistent fremgangsmåde til håndhævelse af kemikalielovgivningen gennem kontrol og andre aktiviteter.

Artikel 123 - Sanktioner ved manglende overholdelse af forordningen

I henhold til denne artikel skal medlemsstaterne indføre sanktioner for manglende overholdelse af forordningens bestemmelser. De sanktioner, der pålægges, skal stå i forhold til omfanget og virkningen af den manglende overholdelse. Erfaringerne med Cleen viser, at der er behov for i et vist omfang at harmonisere de sanktioner, der pålægges, idet der dog skal tages hensyn til behovet for subsidiaritet Forummet skulle sætte medlemsstaterne i stand til at følge en kohærent fremgangsmåde med hensyn til sanktioner.

Artikel 124 - Rapportering

I henhold til denne artikel skal medlemsstaterne rapportere om deres aktiviteter med hensyn til håndhævelse og de sanktioner, der er blevet pålagt for manglende overholdelse det forudgående kalenderår. Sådanne oplysninger vil være nyttige for forummet med henblik på at konstatere hvilke aktioner, der eventuelt kunne være hensigtsmæssige.

2.14. Overgangsbestemmelser og afsluttende bestemmelser

Artikel 125 - Klausul vedrørende fri bevægelighed

Denne er et eksplicit komplement til de forskellige krav i forordningen og omfatter de stoffer alene, i præparater eller i artikler, som opfylder forordningens bestemmelser.

Artikel 126 - Beskyttelsesklausul

Til trods for at forordningen er gennemgribende og vidtrækkende, er det muligt, at en medlemsstat konstaterer en virkning af et stof, som der hurtigt skal gribes ind over for.

Artikel 127 -Begrundelse af afgørelser

Af hensyn til åbenhed og juridisk klarhed skal alle afgørelser, der træffes af de forskellige myndigheder, begrundes.

Artikel 128 - Ændringer af bilagene

Denne artikel gør det muligt for Kommissionen at revidere forordningens bilag I til XVII gennem en udvalgsprocedure, da disse vedrører videnskabelige og tekniske spørgsmål og ikke berører de grundlæggende regler, der er fastlagt i selve forordningen.

Artikel 129 - Gennemførelse af lovgivningen

Denne artikel gør det muligt for Kommissionen at komplementere forordningen gennem komitologiproceduren. Dette er vigtigt for at sætte Kommissionen i stand til at vedtage foranstaltninger, der sikrer en effektiv gennemførelse af REACH.

Artikel 130 - Udvalgsprocedure

Der foreslås to udvalgsprocedurer: proceduren med et rådgivende udvalg og proceduren med et forskriftsudvalg, som fastlagt i afgørelse 1999/468/EF. Hvilken udvalgsprocedure, der foreslås i bestemte artikler i forordningen, afhænger af den foranstaltning, der skal gennemføres, dvs. rådgivningsproceduren for individuelle afgørelser og forskriftsproceduren for generelle foranstaltninger.

Artikel 131 - Overgangsforanstaltninger for agenturet

For nogle af forordningens bestemmelser gælder det, at et ledelsesorgan skal være operationelt fra den dag, forordningen træder i kraft, for at de kan virke efter hensigten, Indtil agenturet bliver operationelt, opfylder Kommissionen denne rolle, især med hensyn til udnævnelse af personale.

Artikel 132 - Overgangsforanstaltninger vedrørende begrænsninger

Der er blevet udført meget arbejde under direktiv 76/769/EØF og forordning (EØF) nr. 793/93. Det er sandsynligt, at nogle af de begrænsninger, der er identificeret i henhold til denne lovgivning, ikke vil være nået hele vejen igennem til en kommissionsbeslutning, inden denne forordning træder i kraft og medfører ophævelsen af direktiv 76/769/EØF og forordning (EØF) nr. 793/93. Denne artikel gør det muligt at gå videre med sådanne begrænsninger og gennemføre dem, uden at det er nødvendigt at gå gennem alle de nye procedurer, der er fastlagt i forordningen.

Artikel 133 - Revidering

Denne forordning er udtryk for en nøje afbalancering af behovet for at beskytte menneskers sundhed og miljøet og behovet for at opretholde og forbedre EU-industriens konkurrenceevne. I stk. 1 i denne artikel bestemmes det, at Kommissionen 12 år efter forordningens ikrafttræden skal tage stilling til om kravene vedrørende kemiske sikkerhedsvurderinger er tilstrækkelige, eller om det er nødvendigt at udvide dem til også at omfatte stoffer fremstillet eller importeret i mængder på under 10 tons pr. år, og at ændre forordningen i overensstemmelse hermed. Stk. 2 indeholder de bestemmelser om revidering og tilpasning, der er omhandlet ovenfor i punkt 2.2 med hensyn til artikel 14 og 37. I lighed hermed indeholder stk. 3 bestemmelser om revidering og eventuel ændring af oplysningskrav for stoffer i mængder på 1 ton eller derover, men under 10 tons, pr. år.

Artikel 134 - Ophævelse

I denne artikel fastsættes, hvilke direktiver og forordninger, der erstattes af denne forordning, som dækker de relevante bestemmelser i direktiverne og forordningerne.

Artikel 135 og 136 - Ændringer

Disse artikler omhandler de nødvendige ændringer af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) nr. ../...[POP-stoffer].

Artikel 137 - Ikrafttræden og anvendelse

I denne artikel fastlægges, hvornår forordningen træder i kraft, og hvornår forpligtelserne i de forskellige dele af forordningen finder anvendelse. Ikke alle forpligtelser finder anvendelse

straks, når forordningen træder i kraft, fordi det kan være nødvendigt først at opfylde andre forpligtelser.

Bestemmelserne vedrørende registrering finder anvendelse 60 dage efter forordningens ikrafttrædelse, således at Kommissionen og agenturet har tilstrækkelig tid til at sikre, at alle systemer er klar til at modtage registreringer. Det er heller ikke ønskeligt at udskyde bestemmelserne om registrering for længe, idet dette ville forhindre nye stoffer i at komme ind på markedet.

Bestemmelserne i artikel 81 og 82, der gælder for udvalgene for risikovurdering og samfundsøkonomisk analyse samt for forummet, finder anvendelse 1 år efter forordningens ikrafttrædelse, således at der er tid til at udnævne en administrerende direktør og en række andre ansatte samt til uformelt at indkalde udvalgene og forummet og til at drøfte arbejdsmetoderne.

Bestemmelserne i artikel 66 til 70 vedrørende begrænsninger finder anvendelse 18 måneder efter forordningens ikrafttrædelse for at sikre, at de nødvendige udvalg er på plads. Kommissionen kan anvende artikel 132 til at hente begrænsninger baseret på eksisterende arbejde.

Bestemmelserne vedrørende stofvurderinger finder anvendelse to år efter forordningens ikrafttrædelse, fordi det er sandsynligt, at der på dette tidspunkt vil foreligge en række registreringer til stofvurdering.

3. BILAG

Bilag I - Almindelige bestemmelser om vurdering af stoffer og udarbejdelse af kemiske sikkerhedsrapporter

Sammen med sikkerhedsdatabladene, vil den kemiske sikkerhedsrapport være et vigtigt værktøj til udvikling af risikovurderinger i henhold til direktiv 98/24/EF om beskyttelse af arbejdstagernes sikkerhed og sundhed under arbejdet mod risici i forbindelse med kemiske agenser. I samråd med interessenterne vil Kommissionen undersøge, hvorledes vurderingskravene i henhold til direktiv 98/24/EF og kravene i henhold til REACH-systemet kan gøres kompatible med hensyn til vejledning og software.

Bilag Ia - Retningslinjer for udarbejdelse af sikkerhedsdatablade

Sikkerhedsdatabladet er det vigtigste værktøj i industrien til formidling af oplysninger gennem forsyningskæden om risici i forbindelse med farlige stoffer og præparater. Bilag Ia er det gamle bilag til direktivet om sikkerhedsdatablade (91/155/EØF), som forklarer hvilke oplysninger, der skal anføres under de 16 rubrikker i sikkerhedsdatabladet. Det er blevet integreret med begreberne kemiske sikkerhedsvurderinger og kemiske sikkerhedsrapporter, som indføres med REACH-systemet. Den kemiske sikkerhedsrapport, der udarbejdes i overensstemmelse med bilag I, og især scenarierne for eksponering, bør anvendes ved udfyldelsen af sikkerhedsdatabladet.

Bilag Ib - Kemiske sikkerhedsvurderinger for præparater

Dette korte bilag skitserer en metode til kemisk sikkerhedsvurdering af præparater. Med hensyn til en række tekniske aspekter afviger det fra metoden i forbindelse med stoffer, der er

beskrevet i bilag I. Kemiske sikkerhedsvurderinger for præparater er tilladt i henhold til artikel 30, stk. 2.

Bilag II - Undtagelser fra registreringspligten efter artikel 4, stk. 2, litra a)

Bilag II og III indeholder lister over stoffer undtaget fra kravet om registrering på grundlag af gældende praksis. Med dette bilag undtages individuelle stoffer efter historisk præcedens.

Bilag III - Undtagelser fra registreringspligten efter artikel 4, stk. 2, litra b)

I dette bilag anføres typer af stoffer for hvilke registrering ville være uhensigtsmæssigt.

Bilag IV - Oplysningskrav omhandlet i artikel 9

Bilag IV indeholder en vejledning i anvendelsen af bilag IV til IX og skitserer de grundlæggende oplysninger, der kræves med hensyn til: generelle oplysninger om registranten, stoffets identitet, oplysninger om stoffet/stoffernes fremstilling og anvendelse/anvendelser samt vejledning i sikker brug.

Bilag V - Standardkrav til oplysninger om stoffer fremstillet eller importeret i mængder på 1 ton eller mere

Bilag VI - Yderligere standardkrav til oplysninger om stoffer fremstillet eller importeret i mængder på 10 tons eller mere

Bilag VII - Yderligere standardkrav til oplysninger om stoffer fremstillet eller importeret i mængder på 100 tons eller mere

Bilag VIII - Yderligere standardkrav til oplysninger om stoffer fremstillet eller importeret i mængder på 1000 tons eller mere

Bilag IX - Almindelige regler for tilpasning af standardtestprogrammet beskrevet i bilag V til VIII

Mængden af oplysninger, der kræves om et stof, stiger gradvist med stoffets mængde, idet kun bilag V er påkrævet for små mængder, og bilag V til VIII for de største mængder.

Bilag V til VIII indeholder specifikke regler for anvendelsen af individuelle oplysningskrav med det formål både at sikre, at der ikke kræves unødvendige oplysninger, og at det kræves af registranterne, at de overvejer, hvornår yderligere oplysninger er hensigtsmæssige. Bilag IX indeholder mere generelle regler vedrørende tilpasningen af de specifikke regler i bilag V til VIII.

Bilag X - Forsøgsmetoder

Dette bilag overtager de forsøgsmetoder, der i øjeblikket indgår i direktiv 67/548/EØF.

Bilag XI - Almindelige bestemmelser om downstream-brugeres vurdering af stoffer og udarbejdelse af kemiske sikkerhedsrapporter

Bilag XI indeholder en klar metode, der gør det muligt for downstream-brugere at gennemføre kemiske sikkerhedsvurderinger og udarbejde kemiske sikkerhedsrapporter vedrørende anvendelser, der ikke omfattet af de sikkerhedsdatablade, som de har fået leveret.

Downstream-brugerne skal bruge de oplysninger, som de har fået af deres leverandører via sikkerhedsdatabladet, samt oplysninger fra andre kilder til at udarbejde et eller flere eksponeringsscenarier og om nødvendigt en nærmere præcisering af farevurderingen eller risikokarakteriseringen med hensyn til deres egen anvendelse eller andre anvendelser nedad i forsyningskæden.

Bilag XII - Kriterier for identifikation af persistente, bioakkumulerbare og giftige stoffer, samt meget persistente og meget bioakkumulerbare stoffer

I dette bilag beskrives identifikationskriterierne for PBT'er og vPvB'er.

Bilag XIII - Fortegnelse over stoffer, der kræver godkendelse

Dette bilag kommer til at indeholde de stoffer, hvis anvendelse er blevet godkendt, idet oplysningerne i artikel 55 specificeres.

Bilag XIV - Dossier

Dette bilag indeholder kravene til et forslag til en begrænsning og forslag til harmoniseret klassificering og etikettering samt identifikation af stoffer som PBT-stoffer, VPVB-stoffer eller tilsvarende problematiske stoffer.

Ethvert forslag skal baseres på en risikovurdering i henhold til de relevante punkter i bilag I, og det skal begrundes, hvorfor det er nødvendig med en aktion på fællesskabsplan.

Disse krav er specificerede for at sikre, at tilstrækkelige oplysninger er til rådighed for de berørte parter til at kommentere risikovurderingen og de i denne forbindelse foreslåede begrænsninger og for agenturets udvalg til at kunne udarbejde en kvalificeret udtalelse.

Dette bilag anses for påkrævet, fordi risikovurderinger indsendt til Kommissionen har været så forskellige med hensyn til konsistens og indhold, at det har været vanskeligt at træffe kvalificerede afgørelser på grundlag af dem. Dette betød, at risikovurderinger somme tider skulle gentages, hvilket har medført betydelige forsinkelser med hensyn til indførelse af begrænsninger.

Bilag XV - Samfundsøkonomisk analyse

I dette bilag skitseres de emneområder, der kan behandles i en samfundsøkonomisk analyse, eller oplysninger, som kan leveres af berørte parter for at hjælpe agenturets udvalg for samfundsøkonomiske analyser med at udarbejde en udtalelse.

Dette bilag specificerer ingen krav, fordi samfundsøkonomiske analyser kan udføres på mange niveauer (f.eks. internationalt, nationalt, regionalt, lokalt) og vedrøre en række forskellige virkninger (f.eks. sociale, forbrugermæssige, industrielle), og det blev vurderet, at et enkelt sæt krav ikke kunne opfylde alle disse behov.

Den samfundsøkonomiske analyse eller bidrag til den er derfor den indsendende persons ansvar. Vedkommende må afgøre, hvilken metode, der er den bedste, og hvilke oplysninger, der skal indsendes.

Det er muligt, at agenturets udvalg for samfundsøkonomiske analyser efter indhøstning af erfaringer vil være i stand til at anbefale Kommissionen mere præcise krav til optagelse i dette bilag.

Bilag XVI - Begrænsninger vedrørende fremstilling, markedsføring og anvendelse af visse farlige stoffer, præparater og artikler

Dette bilag indeholder en fortegnelse over alle stoffer, der er underlagt begrænsninger, og angiver arten af begrænsningerne for disse stoffer alene, i præparater eller i artikler. Disse begrænsninger kan enten bestå af betingelser for fremstilling, anvendelse eller markedsføring eller af forbud mod en af disse aktiviteter. Begrænsningerne i dette bilag er i det væsentligste begrænsninger overtaget fra direktiv 76/769/EØF. Dette direktiv vil blive ophævet ved ikrafttrædelsen af denne forordning. I de kommende år vil dette bilag blive revideret i takt med, at nye begrænsninger vedtages efter bestemmelserne i denne forordning.

Bilag XVI følger de regler, der er opstillet i den interinstitutionelle aftale om en mere systematisk omarbejdning af retsakter (EFT C 77/1 af 28.3.2002). Bilag XVI er blevet udarbejdet for at omarbejde den lovgivning, der vedrører begrænsninger for kemikalier, direktiv 76/769/EØF, der er blevet tilpasset eller ændret mange gange.

Den er ikke hensigten med omarbejdningen i bilag XVI at ændre selve tekstens substans. Navnlig bemærkes, at bilag XVI ikke indeholder tilføjelse af nye stoffer, der ikke tidligere var underlagt begrænsninger i henhold til direktiv 76/769/EØF.

Der er dog blevet indført en række mindre ændringer (fremhævet som tilpasninger), f.eks. med det formål at harmonisere præsentationen med præsentationen i direktiv 67/548/EØF. Dette gælder punkt 26, 31a, 31b, 31c, 31d, 31e, 31g, 31i, 33 og 39. Nogle af disse mindre ændringer er blevet tilføjet for at gøre teksten lettere at læse. Dette gælder punkt 6.1, 6.2, og 23.1. Det gælder også punkt 28, 29 og 30 (tidligere punkt 29, 30 og 31), der er blevet slået sammen i én blok, for deres bestemmelser svarer til hinanden. Overflødige bestemmelser er derfor blevet slettet.

Nogle sletninger er foretaget for at ajourføre teksten og fjerne f.eks. gamle datohenvisninger. Dette gælder f.eks. punkt 1.1(a), 1.1(b), 1.1(c), 1.1(d), 1.1.e, 1.5, 18.2, 23.1.2, 23.4, 24.1, 24.2.(a), 24.3 og 42.2. Der er også foretaget nogle tilføjelser for at ajourføre henvisninger til flere direktiver citeret i den konsoliderede tekst. Dette gælder f.eks. punkt 3, 5.3.(a), 5.3(c), 12(1), 28, 29 og 30 (stk. 1 og 2) og 32.

Nogle få ændringer var nødvendige med hensyn til PCB, fordi det pågældende stof indgik i bilag XVII i stedet for bilag XVI som følge af konventionen om POP-stoffer (persistente organiske miljøgifte). Dette gælder punkt 1(c), 1.4 og 1.6.

I nogle tilfælde er der foretaget ændringer, fordi forordningen er rettet til operatører i stedet for til medlemsstater. Dette gælder f.eks. punkt 1.6 og tillæg 7 (punkt 7).

Bilag XVII - Persistente organiske miljøgifte (POP-stoffer)

Dette bilag vil indeholde en fortegnelse over alle stoffer og enkeltheder om begrænsninger fra Stockholm-konventionen og UNECE-protokollen om POP-stoffer (persistente organiske miljøgifte). Ved at optage disse begrænsninger i dette bilag og derved i fællesskabsretten, opfylder Det Europæiske Fællesskab en del af sine forpligtelser i henhold til den internationale konvention.

2003/0256 (COD)

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS FORORDNING

om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemiske stoffer (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) nr. …/… {om persistente organiske miljøgifte}

EUROPA-PARLAMENTET OG RÅDET FOR DEN EUROPÆISKE UNION HAR -

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab, særlig artikel 95,

under henvisning til forslag fra Kommissionen[1],

under henvisning til udtalelse fra Det Europæiske Økonomiske og Sociale Udvalg[2],

efter proceduren i traktatens artikel 251[3], og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Stoffers frie bevægelighed alene, i præparater og i artikler er et væsentligt aspekt af det indre marked og bidrager i betydelig grad til forbrugernes og arbejdstagernes sundhed og velvære og til deres sociale og økonomiske interesser samt til den kemiske industris konkurrenceevne.

(2) Det indre marked for stoffer i Fællesskabet kan kun fungere effektivt, hvis kravene til stofferne ikke afviger væsentligt fra medlemsstat til medlemsstat.

(3) Der bør sikres en høj grad af sundhedsbeskyttelse og miljøbeskyttelse ved tilnærmelse af lovgivningerne om stoffer med det mål at opnå en bæredygtig udvikling. Denne lovgivning bør anvendes på en ikke-diskriminerende måde, uanset om de kemiske stoffer handles på det indre marked eller internationalt.

(4) For at bevare det indre markeds integritet og sikre en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed, navnlig arbejdstagernes sundhed, og af miljøet, er det nødvendigt at sikre, at de stoffer, der fremstilles i Fællesskabet, er i overensstemmelse med fællesskabsretten, også selv om de eksporteres.

---

1 EUT C
2 EUT C
3 EUT C

(5) En evaluering[4] af de fire vigtigste retsakter vedrørende kemikalier i Fællesskabet (Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer[5], Rådets direktiv 88/379/EØF af 7. juni 1988 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige præparater[6], (i mellemtiden erstattet af Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/45/EF af 31. maj 1999 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige præparater[7]), Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 af 23. marts 1993 om vurdering af og kontrol med risikoen ved eksisterende stoffer[8], og Rådets direktiv 76/769/EØF af 27. juli 1976 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om begrænsning af markedsføring og anvendelse af visse farlige stoffer og præparater[9] har påvist en række problemer med hensyn til, hvordan Fællesskabets lovgivning om kemikalier fungerer, og dette har ført til afvigelser imellem love, bekendtgørelser og administrative bestemmelser i medlemsstaterne, hvilket direkte påvirker det indre marked på dette område.

(6) Stoffer under toldkontrol, som er midlertidigt oplagret, befinder sig i frizoner eller på frilagre med henblik på reeksport eller i transit, anvendes ikke betydningen i denne forordning, og er derfor også udelukket fra dette systems anvendelsesområde.

(7) Et vigtigt mål med det nye system, der vil blive skabt med denne forordning, er at fremme substitution af farlige stoffer med mindre farlige stoffer eller teknologier i de tilfælde, hvor der findes egnede alternativer. Denne forordning berører ikke anvendelsen af direktiver om arbejdstagernes beskyttelse, navnlig Rådets direktiv 90/394/EØF af 28. juni 1990 om beskyttelse af arbejdstagerne mod risici for under arbejdet at være udsat for kræftfremkaldende stoffer (sjette særdirektiv i henhold til artikel 16, stk. 1, i direktiv 89/391/EØF)[10], i henhold til hvilket arbejdsgiverne skal fjerne skadelige stoffer, når dette er teknisk muligt, eller erstatte farlige stoffer med mindre farlige stoffer.

(8) Ansvaret for styring af risici i forbindelse med stoffer bør placeres hos de virksomheder, der fremstiller, importerer, markedsfører eller anvender disse stoffer.

(9) Af disse grunde kræver registreringsbestemmelserne, at producenter og importører genererer data om de stoffer, som de fremstiller eller importerer, anvender disse data til at vurdere risici i forbindelse med stofferne og til at udarbejde og anbefale passende risikostyringsforanstaltninger. For at sikre, at de opfylder disse forpligtelser, samt af hensyn til gennemsigtigheden, skal de ved registreringen indsende et dossier med alle

---

4 Kommissionens arbejdsdokument SEK(1998) 1986 endelig, som henvist til i Kommissionens hvidbog om en strategi for en ny kemikaliepolitik, (KOM(2001) 88 endelig) af 27.2.2001.

5 EFT L 196 af 16.8.1967, s. 1. Direktivet er senest ændret ved forordning (EF) nr. 807/2003 (EUT L 122 af 16.5.2003, s. 36).

6 EFT L 187 af 16.7.1988, s. 14.

7 EFT L 200 af 30.7.1999, s. 1. Direktivet er senest ændret ved Kommissionens direktiv 2001/60/EF (EFT L 226 af 22.8.2001, s. 5).

8 EFT L 84 af 5.4.1993, s. 1.

9 EFT L 262 af 27.9.1990, s. 1. Direktivet er senest ændret ved Europa-Parlamentet og Rådets direktiv 2003/53/EF (EUT L 178 af 17.7.2003, s. 24).

10 EFT L 196 af 26.7.1990, s. 1. Direktivet er senest ændret ved direktiv 1999/38/EF (EFT L 138 af 1.6.1999, s. 66).

disse oplysninger til det agentur, der oprettes ved denne forordning. Registrerede stoffer bør kunne bevæge sig frit inden for det indre marked.

(10) I henhold til vurderingsbestemmelserne skal der foretages en opfølgning af registreringen, hvor det kontrolleres, at registreringerne er i overensstemmelse med denne forordnings krav, og hvor der gives mulighed for at generere flere oplysninger om stoffers egenskaber. Medlemsstater bør vurdere sådanne stoffer, hvis de har grund til at formode, at sådanne stoffer udgør en risiko for sundheden eller miljøet, og efter at de er blevet optaget i deres rullende planer.

(11) Selv om oplysninger om stoffer fremkommet gennem vurderinger først og fremmest skal anvendes af producenter og importører til styring af risici i forbindelse med deres stoffer, kan de også bruges til at indlede godkendelses- eller begrænsningsprocedurer i henhold til denne forordning eller risikostyringsprocedurer inden for rammerne af anden fællesskabslovgivning; det bør derfor sikres, at sådanne oplysninger er til rådighed for de relevante myndigheder og kan anvendes af dem i forbindelse med sådanne procedurer.

(12) I henhold til godkendelsesbestemmelserne giver Kommissionen godkendelser til markedsføring og anvendelse af meget problematiske stoffer, hvis risiciene i forbindelse med deres anvendelse allerede er tilstrækkeligt styrede, eller hvis anvendelsen kan begrundes ud fra samfundsøkonomiske hensyn.

(13) Bestemmelserne vedrørende begrænsninger giver mulighed for helt eller delvist at forbyde fremstilling, markedsføring og anvendelse af stoffer, der indebærer risici, der skal gribes ind over for, eller fastlægge andre begrænsninger for sådanne stoffer på grundlag af en vurdering af de pågældende risici.

(14) Der er et behov for at sikre en effektiv styring af de tekniske, videnskabelige og administrative aspekter af denne forordning på fællesskabsplan. Der bør derfor oprettes en central enhed til at opfylde denne rolle.

(15) I en feasibility-undersøgelse om ressourcebehovene i forbindelse med en central enhed blev det konkluderet, at en uafhængig central enhed ville indebære en række fordele på længere sigt i forhold til andre løsningsmuligheder. Et europæisk kemikalieagentur, herefter benævnt "agenturet", bør derfor oprettes.

(16) Erfaringerne har vist, at det er uhensigtsmæssigt at kræve af medlemsstaterne, at de vurderer risiciene i forbindelse med alle kemiske stoffer. Dette ansvar bør derfor først og fremmest overdrages til de virksomheder, der fremstiller eller importerer stoffer, men kun når de gør dette i mængder over visse tærskelværdier, således at de bliver i stand til at bære byrderne i forbindelse hermed. Disse virksomheder bør træffe de nødvendige risikostyringsforanstaltninger i overensstemmelse med deres vurderinger af risiciene i forbindelse med deres stoffer.

(17) For at foretage en effektiv kemisk sikkerhedsvurdering af stoffer skal producenter og importører af stoffer fremskaffe oplysninger om disse, om nødvendigt ved at gennemføre nye forsøg.

(18) Med henblik på håndhævelse og vurdering og af hensyn til åbenheden, bør oplysninger om disse stoffer samt relaterede oplysninger, herunder oplysninger om

risikostyringsforanstaltninger, indberettes til myndighederne, undtagen i nærmere fastsatte tilfælde, hvor sådan indberetning ville være ude af proportioner.

(19) Videnskabelig forskning og udvikling finder normalt sted med mængder på under 1 ton pr. år, og det er derfor ikke nødvendigt at undtage sådan forskning og udvikling, fordi stoffer i disse mængder slet ikke skal registreres. For at fremme innovation, bør produktforskning og procesorienteret forskning og udvikling imidlertid undtages fra forpligtelsen til at registrere i en vis periode, hvor det endnu ikke er hensigten at markedsføre et stof over for et ubegrænset antal kunder, fordi dets anvendelse i præparater eller artikler stadig kræver yderligere forskning og udvikling, som skal udføres af et begrænset antal kendte kunder.

(20) Da producenter og importører af artikler bør være ansvarlige for deres artikler, er det hensigtsmæssigt at pålægge registreringskrav for stoffer, der er beregnet til at blive frigivet fra artikler. Hvis der er tale om stoffer, som med sandsynlighed frigives fra artikler i tilstrækkeligt store mængder og på sådan en måde, at det skader menneskers sundhed eller miljøet, bør agenturet underrettes, og det bør have beføjelser til at kræve, at der indsendes en registrering.

(21) Kravene til producenterne og importørerne i forbindelse med udførelse af kemiske sikkerhedsvurderinger bør beskrives udførligt i et teknisk bilag, for at sætte dem i stand til at opfylde deres forpligtelser. For at opnå en rimelig deling af byrden med deres kunder bør producenter og importører i deres kemiske sikkerhedsvurdering ikke blot behandle deres egne anvendelser og de anvendelser, som de markedsfører deres stoffer til, men også andre anvendelser, som deres kunder beder dem behandle.

(22) Det bør ikke være nødvendigt at foretage en kemisk sikkerhedsvurdering for stoffer i præparater i visse meget små koncentrationer, som anses for ikke at være problematiske. Stoffer i præparater i så små koncentrationer bør også undtages fra godkendelse. Disse bestemmelser bør ligeledes finde anvendelse på præparater, der er blandinger i faste former af stoffer, indtil et sådant præparat gives en bestemt form, der ændrer det til en artikel.

(23) Et medlem af en gruppe af flere registranter bør have lov til at indsende oplysninger på vegne af de andre i henhold til regler, der sikrer, at alle påkrævede oplysninger indsendes, samtidigt med at det bliver muligt at omkostningsbyrden deles.

(24) Kravene til generering af oplysninger om stoffer bør være opdelt i trin i henhold til den mængde af et stof, der fremstilles eller importeres, fordi mængden giver en indikation af menneskers og miljøets potentielle eksponering for stoffer, og kravene bør beskrives udførligt.

(25) Hvis der udføres forsøg, skal dette ske i overensstemmelse med de relevante krav til beskyttelse af laboratoriedyr, der er fastsat i Rådets direktiv 86/609/EØF af 24. november 1986 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om beskyttelse af dyr, som anvendes til forsøg og andre videnskabelige formål[11], og i overensstemmelse med god laboratoriepraksis som fastsat i Rådets direktiv 87/18/EØF af 18. december 1986 om indbyrdes tilnærmelse af

[11] EFT L 358 af 18.12.1986, s. 1. Direktiv ændret ved Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2003/65/EF (EUT L 230 af 16.9.2003, s. 32).

lovgivning om anvendelse af principper for god laboratoriepraksis og om kontrol med deres anvendelse ved forsøg med kemiske stoffer[12].

(26) Generering af oplysninger med alternative midler, der giver resultater svarende til de foreskrevne forsøg og forsøgsmetoder, bør også tillades, f.eks. når disse oplysninger kommer fra gyldige kvalitative eller kvantitative modeller for struktur-aktivitet relationer eller fra strukturelt beslægtede stoffer. Med henblik herpå bør agenturet i samarbejde med medlemsstaterne og berørte parter udarbejde passende retningslinjer. Endelig bør det være muligt ikke at indsende visse oplysninger, hvis dette kan behørigt begrundes.

(27) De foreskrevne forsøgsmetoder bør konsolideres af hensyn til gennemskueligheden og for at fremme, at virksomhederne anvender kravene korrekt.

(28) Af praktiske grunde og på grund af deres særlige art, bør der fastsættes særlige registreringskrav for mellemprodukter; polymerer bør fritages for registrering og vurdering, indtil dem, der skal registreres som følge af risici for menneskers sundhed eller miljøet, kan udvælges på en praktisk og omkostningseffektiv måde på grundlag af sunde tekniske og gyldige videnskabelige kriterier.

(29) For at undgå at overbelaste myndighederne og virksomhederne med arbejde som følge af registrering af stoffer, der allerede findes på det indre marked, bør sådan registrering fordeles over en passende periode, uden at der dog derved skabes unødig forsinkelse. Der bør derfor fastsættes frister for registrering af disse stoffer.

(30) Data vedrørende stoffer, der allerede er anmeldt i henhold til direktiv 67/548/EØF, bør lempes ind i systemet og bør opgraderes, når den næste grænsemængde i tons nås.

(31) For at skabe et harmoniseret, enkelt system bør alle registreringer indsendes til agenturet. For at sikre en konsistent fremgangsmåde og en effektiv anvendelse af ressourcerne, bør dette foretage en fuldstændighedskontrol af alle registreringer og tage ansvaret for eventuelle endelige afvisninger af registreringer.

(32) For at sikre, at de oplysninger, der er til rådighed for myndighederne, ajourføres, bør der indføres en forpligtelse til at underrette agenturet om visse ændringer af oplysningerne.

(33) Der bør tilskyndes til deling og fælles indsendelse af oplysninger for at forøge denne forordnings effektivitet i hele Fællesskabet.

(34) Antallet af hvirveldyr, der bruges til forsøg, bør reduceres til et minimum i overensstemmelse med bestemmelserne i direktiv 86/609/EØF. Når det er muligt, bør brug af dyr altid undgås gennem anvendelse af alternative metoder valideret af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder eller andre internationale organer.

(35) Denne forordning bør ikke påvirke den fulde anvendelse af Fællesskabets konkurrenceregler.

---

[12] EFT L 15 af 17.1.1987, s. 29. Direktivet er senest ændret ved Kommissionens direktiv 1999/11/EF (EFT L 77 af 23.3.1999, s. 8).

(36) For at undgå overlapning af arbejdet, og især for at reducere forsøg med hvirveldyr, bør kravene med hensyn til udarbejdelse og indsendelse af registreringer og ajourføringer tilskynde registranterne til at tjekke de databaser, der oprettes i agenturet, og til at træffe alle rimelige foranstaltninger med henblik på at nå til enighed om deling af oplysninger.

(37) Det er i offentlighedens interesse at sikre, at forsøgsresultater vedrørende bestemte stoffers farer med hensyn til menneskers sundhed eller miljøet hurtigst muligt videreformidles til de virksomheder, som anvender dem, for at begrænse enhver risiko i forbindelse med deres anvendelse. Der bør derfor tilskyndes til deling af data på betingelser, der sikrer en rimelig kompensation for den virksomhed, der har udført forsøgene.

(38) For at respektere de legitime ejendomsrettigheder for dem, der genererer forsøgsdata, skal disse i en periode på 10 år have et krav på kompensation over for de registranter, der drager fordel af disse data.

(39) For at gøre det muligt for en potentiel registrant at gå videre med registreringen, også selv om han ikke kan nå til enighed med en tidligere registrant, bør agenturet på anmodning give adgang til resuméer eller fyldige undersøgelsesresuméer vedrørende forsøg, som allerede er indsendt. Den registrant, som modtager disse data bør være forpligtet til at betale et bidrag til omkostningerne til den, der har frembragt dataene.

(40) For at undgå overlapning af arbejdet og især for at undgå, at forsøg udføres flere gange, bør registranter af indfasningsstoffer så tidligt som muligt præregistrere disse stoffer i en database, som forvaltes af agenturet. Der bør etableres et system, der skal hjælpe registranter med at finde andre registranter og danne konsortier. For at sikre, at et sådant system fungerer gnidningsfrit, skal de opfylde visse forpligtelser. Hvis et medlem af et forum til udveksling af oplysninger om stoffer (SIEF - Substance Information Exchange Forum) ikke opfylder sine forpligtelser, overholder han ikke forordningens bestemmelser, og bør straffes herfor, men andre medlemmer bør kunne fortsætte udarbejdelsen af deres egen registrering.

(41) En del af ansvaret for risikostyring i forbindelse med stoffer består i formidlingen af oplysninger om disse stoffer til andre fagfolk. Dette er også en forudsætning for at disse andre fagfolk kan opfylde deres forpligtelser.

(42) Da det eksisterende sikkerhedsdatablad allerede bruges som et kommunikations-værktøj i forsyningskæden for stoffer og præparater, er det hensigsmæssigt af udvikle det yderligere og gøre det til en integreret del af det system, der etableres med denne forordning.

(43) For at opnå en "ansvarskæde" bør downstream-brugere være ansvarlige for vurdering af de risici, der opstår som følge af deres anvendelser af stoffer, hvis disse risici ikke er omfattet af et sikkerhedsdatablad modtaget fra deres leverandører, medmindre den pågældende downstream-bruger træffer mere vidtgående foranstaltninger end dem, der er blevet anbefalet ham af hans leverandør, eller medmindre hans leverandør ikke var forpligtet til at vurdere disse risici eller levere ham oplysninger om disse risici; af samme grund bør downstream-brugere styre de risici, som følger af deres anvendelser af disse stoffer.

(44) Kravene til downstream-brugerne i forbindelse med udførelse af kemiske sikkerhedsvurderinger bør også beskrives udførligt, for at sætte dem i stand til at opfylde deres forpligtelser.

(45) Med henblik på håndhævelse og vurdering bør downstream-brugere af stoffer være forpligtet til at indberette visse oplysninger, hvis deres anvendelse ligger uden for betingelserne i det eksponeringsscenario, der er beskrevet i det sikkerhedsdatablad, som de har modtaget fra deres oprindelige producent eller importør, og til at holde sådanne indberettede oplysninger ajourført.

(46) Af praktiske grunde og af hensyn til proportionaliteten er det hensigtsmæssigt at fritage downstream-brugere, der anvender små mængder af et stof, fra sådan indberetning.

(47) Det ville være nødvendigt at bruge et betydeligt antal dyr til forsøg, hvis man skulle opfylde de mere krævende oplysningskrav for visse stoffer, hvis disse oplysningskrav automatisk fandt anvendelse. Forsøg kan medføre betydelige omkostninger for virksomhederne. Det er derfor nødvendigt at sikre, at frembringelsen af sådanne oplysninger er tilpasset de reelle informationsbehov. Med henblik herpå bør vurderingen kræve af medlemsstaterne, at de udarbejder afgørelser, og af agenturet, at det træffer afgørelse om de forsøgsprogrammer, som foreslås af producenter og importører af sådanne stoffer. Den medlemsstat, i hvilken fremstillingen finder sted eller importøren er etableret, bør have ansvaret for vurdering af forslag til forsøg.

(48) Det er desuden nødvendigt at skabe tillid til kvaliteten af registreringerne generelt og at sikre, at offentligheden og alle interessenter i den kemiske industri har tillid til, at virksomhederne opfylder de forpligtelser, som de er blevet pålagt. Det er derfor hensigtsmæssigt, at den samme medlemsstat gives beføjelser til at kontrollere registreringerne med dette for øje.

(49) Agenturet bør også have beføjelser til at kræve yderligere oplysninger fra producenter, importører eller downstream-brugere om stoffer, hvor der er mistanke om risici for sundhed eller miljø, herunder risici som følge af, at de er til stede i det indre marked i store mængder, på grundlag af vurderinger foretaget af de kompetente myndigheder i medlemsstaterne. Medlemsstaterne bør planlægge og stille ressourcer til rådighed herfor gennem udarbejdelse af rullende planer. Hvis en risiko, der er problematisk i samme grad som brugen af stoffer, der kræver godkendelse, opstår som følge af anvendelsen af isolerede mellemprodukter på stedet, kan medlemsstaterne også kræve yderligere oplysninger, hvis dette er begrundet.

(50) Kollektiv enighed mellem medlemsstaternes myndigheder om deres udkast til afgørelser skaber grundlaget for et effektivt system, der respekterer subsidiaritets-princippet, samtidig med at det indre marked opretholdes. Hvis en eller flere medlemsstater eller agenturet ikke kan tilslutte sig udkastet til en afgørelse, bør denne være underlagt en centraliseret procedure. Agenturet bør træffe afgørelserne efter anvendelsen af disse procedurer.

(51) En vurdering kan føre til den konklusion, at der skal træffes en foranstaltning i henhold til begrænsnings- eller godkendelsesprocedurerne, eller at en risikostyrings-foranstaltning bør overvejes inden for rammerne af anden relevant lovgivning. Oplysninger om behandlingen af vurderinger bør derfor offentliggøres.

(52) For at sikre en tilstrækkelig høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet bør stoffer med meget problematiske egenskaber behandles på en særlig måde, i henhold til hvilken de virksomheder, som anvender dem, skal påvise overfor den godkendende myndighed, at risiciene styres på passende vis. Hvis dette ikke er tilfældet, kan der stadig gives godkendelse til anvendelser, hvis virksomhederne godtgør, at fordelene for samfundet som følge af brugen af stoffet mere end opvejer risiciene i forbindelse med dets anvendelse, og at der ikke findes passende alternative stoffer eller teknologier. Den godkendende myndighed bør derefter gennem en godkendelsesprocedure baseret på ansøgninger fra virksomhederne kontrollere, at disse krav er opfyldt Da godkendelser skal sikre en høj grad af beskyttelse i hele det indre marked, er det hensigtsmæssigt, at Kommissionen er den myndighed, der udsteder godkendelser.

(53) Erfaringer på internationalt niveau viser, at stoffer med karakteristika, der gør dem persistente, tilbøjelige til at være bioakkumulerende og toksiske, eller meget persistente og meget tilbøjelige til at være bioakkumulerende, er stoffer med meget problematiske egenskaber, og der er blevet udarbejdet kriterier, der gør det muligt at identificere sådanne stoffer. For visse andre stoffer er egenskaberne tilstrækkeligt problematiske til, at de bør behandles på samme måde på ad hoc-basis.

(54) Af hensyn til funktionsdygtigheden og af praktiske grunde både med hensyn til virksomhederne, der skal udarbejde ansøgningerne og gennemføre passende risikostyringsforanstaltninger, og myndighederne, der skal behandle ansøgningerne om godkendelse, bør det kun være et begrænset antal stoffer, der behandles i godkendelsesproceduren på samme tid, og der bør fastsættes realistiske frister for ansøgninger, samtidig med at det gøres muligt at undtage visse anvendelser.

(55) Agenturet bør yde rådgivning om prioriteringen af stoffer, der skal behandles i godkendelsesproceduren, for at sikre, at afgørelserne er et udtryk for samfundets behov samt for videnskabelig viden og udvikling.

(56) Et fuldstændigt forbud mod et stof ville betyde, at ingen af dets anvendelser ville kunne godkendes. Det ville derfor være meningsløst at tillade indsendelse af ansøgninger om godkendelse. I sådanne tilfælde bør stoffet fjernes fra listen over stoffer, for hvilke der kan indsendes ansøgninger.

(57) For at skabe en harmoniseret fremgangsmåde med hensyn til godkendelse af anvendelser af bestemte stoffer, bør agenturet afgive udtalelser om de risici, som disse anvendelser indebærer, og om eventuelle samfundsøkonomiske analyser, som indsendes af tredjeparter.

(58) For at sikre en effektiv overvågning og håndhævelse af godkendelseskravene, bør downstream-brugere, der nyder godt af en godkendelse tildelt deres leverandør, informere agenturet om deres brug af stoffet.

(59) For at sætte mere fart i det nuværende system, bør begrænsningsproceduren omstruktureres, og den bør erstatte direktiv 76/769/EØF, som flere gange er blevet ændret og tilpasset i betydeligt omfang. De harmoniserede regler i bilaget til ovennævnte direktiv bør overtages i en omarbejdet form for at opnå klarhed og som et udgangspunkt for denne nye og hurtigere begrænsningsprocedure. Omarbejdelsen følger de regler, der er opstillet i den interinstitutionelle aftale om en mere systematisk omarbejdning af retsakter.

(60) Det er producentens, importørens og downstream-brugerens ansvar at finde frem til de risikostyringsforanstaltninger, der er nødvendige for at sikre en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet i forbindelse med fremstilling, markedsføring og anvendelse af et stof alene, i et præparat eller i en artikel. Hvis disse imidlertid anses for at være utilstrækkelige, og hvis fællesskabslovgivning er begrundet, bør der fastsættes passende begrænsninger.

(61) For at beskytte menneskers sundhed og miljøet kan begrænsninger vedrørende fremstilling, markedsføring eller anvendelse af et stof alene, i et præparat eller i en artikel omfatte betingelser for, eller forbud mod, fremstilling, markedsføring eller anvendelse. Det er derfor nødvendigt at udarbejde en fortegnelse over sådanne begrænsninger og ændringer af denne.

(62) For at kunne udarbejde et forslag til begrænsninger og for at en sådan lovgivning kan fungere tilfredsstillende, bør der være et godt samarbejde, en god koordinering og udveksling af information mellem medlemsstaterne, agenturet, andre fællesskabsorganer, Kommissionen og de berørte parter.

(63) For at give medlemsstaterne mulighed for at indsende forslag vedrørende indgriben over for specifikke risici for menneskers sundhed eller miljøet, bør de udarbejde et dossier i overensstemmelse med detaljerede krav. Dette dossier bør indeholde en begrundelse for en indsats på fællesskabsplan.

(64) For at skabe en harmoniseret fremgangsmåde med hensyn til begrænsninger bør agenturet opfylde en rolle som koordinator af denne procedure, f.eks. ved at udpege de relevante rapportører og kontrollere overensstemmelsen med kravene i de relevante bilag.

(65) For at give Kommissionen mulighed for at gribe ind over for en bestemt risiko for menneskers sundhed og miljøet, som kræver en indsats på fællesskabsplan, bør den kunne overdrage agenturet udarbejdelsen af et dossier vedrørende en begrænsning.

(66) Af hensyn til åbenheden bør agenturet offentliggøre det relevante dossier, herunder de foreslåede begrænsninger, samtidig med at det anmoder om kommentarer.

(67) For at afslutte proceduren i rette tid bør agenturet fremsende sine udtalelser om den foreslåede aktion og dens virkninger på grundlag af et udkast til en udtalelse udarbejdet af en rapportør.

(68) For at fremskynde begrænsningsproceduren bør Kommissionen udarbejde udkast til ændring inden for tre måneder efter modtagelse af agenturets udtalelser.

(69) Agenturet bør have en central rolle med hensyn til at sikre, at kemikalielovgivningen og beslutningsprocesserne samt det videnskabelige grundlag for disse nyder troværdighed hos alle interessenter og offentligheden. Det er derfor af afgørende betydning, at Fællesskabets institutioner, medlemsstaterne, offentligheden i almindelighed og de berørte parter har tillid til agenturet. Af denne grund er det afgørende at sikre dets uafhængighed, at det har en stor videnskabelig og teknisk kapacitet samt en stor kapacitet med hensyn til regulering, at der er åbenhed, og at det er effektivt.

(70) Agenturets struktur bør være egnet til de arbejdsopgaver, som det skal udføre. Erfaringer med lignende fællesskabsagenturer giver nogle retningslinjer i denne

henseende, men strukturen bør tilpasses for at opfylde de specifikke behov i forbindelse med denne forordning.

(71) Af hensyn til effektiviteten bør personalet i agenturets sekretariat i det væsentligste udføre teknisk-administrative og videnskabelige arbejdsopgaver uden at trække på medlemsstaternes videnskabelige og tekniske ressourcer. Den administrerende direktør bør sikre en effektiv udførelse af agenturets arbejdsopgaver på uafhængig vis. For at sikre, at agenturet opfylder dets rolle, bør sammensætningen af bestyrelsen være således, at den sikrer den højeste standard med hensyn til kompetence og en bred vifte af relevant ekspertise inden for kemisikkerhed eller -regulering.

(72) Agenturet bør råde over de nødvendige midler til at udføre alle de påkrævede arbejdsopgaver og sætte det i stand til at opfylde dets rolle.

(73) Bestyrelsen bør have de nødvendige beføjelser til at fastlægge et budget, kontrollere dets gennemførelse, fastsætte gebyrernes struktur og størrelse, udarbejde en forretningsorden, vedtage finansregulativer og udpege den administrerende direktør.

(74) Det er hensigtsmæssigt, at agenturets bestyrelse omfatter repræsentanter for andre berørte parter som f.eks. industrien, ikke-statslige organisationer eller den akademiske verden.

(75) Gennem udvalget for risikovurdering og udvalget for samfundsøkonomisk analyse bør agenturet overtage den rolle, som nu udføres af de videnskabelige udvalg, der er tilknyttet Kommissionen, med hensyn til afgivelse af videnskabelige udtalelser inden for dens kompetenceområde.

(76) Gennem medlemsstatsudvalget bør agenturet sigte mod at der opnås enighed mellem medlemsstaternes myndigheder om bestemte spørgsmål, som kræver en harmoniseret fremgangsmåde.

(77) Det er vigtigt at sikre et tæt samarbejde mellem agenturet og de kompetente myndigheder i medlemsstaterne, således at de videnskabelige udtalelser fra udvalget for risikoanalyse og udvalget for samfundsøkonomisk analyse kan baseres på den bredest mulige relevante videnskabelige og tekniske ekspertise, som er til rådighed i Fællesskabet. Udvalgene bør også kunne inddrage særlig ekspertise.

(78) Agenturet bør også skabe et forum for medlemsstaterne, hvor de kan udveksle oplysninger og koordinere deres aktiviteter med hensyn til håndhævelse af kemikalielovgivningen. Det nuværende uformelle samarbejde mellem medlemsstaterne på dette område vil kunne drage fordel af mere formelle rammer.

(79) Det bør oprettes et appeludvalg i agenturet, for at sikre operatører, der berøres af agenturets afgørelser, en juridisk ret til at appellere.

(80) Agenturet bør finansieres dels af gebyrer betalt af virksomhederne og dels over De Europæiske Fællesskabers almindelige budget. Fællesskabets budgetprocedure bør finde anvendelse for så vidt angår enhver tilskud, som kommer fra De Europæiske Fællesskabers almindelige budget. Desuden bør regnskaberne revideres af Revisionsretten i overensstemmelse med artikel 91 i Kommissionens forordning (EF, Euratom) nr. 2343/2002 af 23. december 2002 om rammefinansforordning for de organer, der er omhandlet i artikel 185 i Rådets

forordning (EF, Euratom) nr. 1605/2002 om finansforordningen vedrørende De Europæiske Fællesskabers almindelige budget[13].

(81) Hvis Kommissionen og agenturet anser det for hensigtsmæssigt, bør det være muligt for andre lande at deltage i agenturets arbejde.

(82) Agenturet bør gennem samarbejde med organisationer med interesse i harmoniseringen af internationale bestemmelser bidrage til Fællesskabets og medlemsstaternes rolle i sådant harmoniseringsarbejde.

(83) Agenturet bør stille den nødvendige infrastruktur til rådighed for virksomhederne, så disse kan opfylde deres forpligtelser i henhold til bestemmelserne om datadeling.

(84) Det er vigtigt at undgå en sammenblanding af de opgaver, der udføres af agenturet, og de opgaver, der udføres af henholdsvis Det Europæiske Agentur for Lægemiddelvurdering (EMEA), der blev oprettet ved Rådets forordning (EF) nr. 2309/93 af 22. juli 1993 om fastlæggelse af fællesskabsprocedurer for godkendelse og overvågning af human- og veterinærmedicinske lægemidler og om oprettelse af et europæisk agentur for lægemiddelvurdering[14] [insert new title plus footnote when proposal – COM(2001) 0404, COD 2001/0252 – is enacted], Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet (EFSA), der blev oprettet ved Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 178/2002 af 28. januar 2002 om generelle principper og krav i fødevarelovgivningen, om oprettelse af Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet og om procedurer vedrørende fødevaresikkerhed[15] og Det Rådgivende Udvalg for Sikkerhed og Sundhed på Arbejdspladsen, der blev oprettet ved Rådets afgørelse 2003/913/EF[16]. Agenturet bør derfor opstille procedureregler for de tilfælde, hvor det er nødvendigt at samarbejde med EFSA eller Det Rådgivende Udvalg for Sikkerhed og Sundhed på Arbejdspladsen. Det er nødvendigt at fastslå, at denne forordning ellers er uden indflydelse på de beføjelser, der er tillagt EMEA, EFSA og Det Rådgivende Udvalg for Sikkerhed, og Sundhed på Arbejdspladsen i kraft af fællesskabslovgivningen.

(85) I feasilbility-undersøgelsen om ressourcebehovene i forbindelse med en central enhed blev det konkluderet, at den vigtigste udfordring i forbindelse med at få agenturet til at fungere effektivt, var dets evne til tiltrække det rette personale, herunder dem, der arbejder i Det Europæiske Kemikaliekontor under Kommissionens Fælles Forskningscenter. Agenturet bør derfor placeres på et sted, hvor det kan få det rette personale i startperioden og også på længere sigt.

(86) For at få det indre marked til at fungere for stoffer alene eller i præparater, samtidig med at man sikrer en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet bør der fastlægges regler for en fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer.

---

13 EFT L 357 af 31.12.2002, s. 72.

14 EFT L 214 af 24.8.1993, s. 1. Forordningen er senest ændret ved forordning (EF) nr. 1647/2003 (EUT L 245 af 29.9.2003, s.19).

15 EFT L 31 af 1.2.2002, s. 1. Forordningen er senest ændret ved forordning (EF) nr. 1642/2003 (EUT L 245 af 29.9.2003, s. 4).

16 EUT C 218 af 13.9.2003, s. 1.

(87) Klassificering og etikettering af ethvert stof, der enten er underlagt kravet om registrering eller omfattet af artikel 1 i direktiv 67/548/EØF, og som markedsføres, bør derfor anmeldes til agenturet.

(88) For at sikre en harmoniseret beskyttelse af offentligheden i almindelighed og i særdeleshed af personer, der kommer i berøring med bestemte stoffer, bør en fortegnelse registrere klassificeringer i overensstemmelse med direktiv 67/548/EØF og direktiv 1999/45/EF, som der om muligt er opnået enighed om mellem producenter og importører af samme stof, samt afgørelser truffet på fællesskabsniveau for at harmonisere klassificering og etikettering af nogle stoffer.

(89) Ressourcerne bør koncentreres om stoffer med de mest problematiske egenskaber. Et stof bør derfor kun optages i bilag I til direktiv 67/548/EØF, hvis det opfylder kriterierne for klassificering som kræftfremkaldende, mutagent eller reproduktionstoksisk i kategori 1, 2 eller 3, eller som et luftbåret allergen. Der bør fastsættes bestemmelser, der giver de kompetente myndigheder mulighed for at fremsende forslag til agenturet. Agenturet bør afgive dets udtalelse om forslaget, og de berørte parter bør have mulighed for at kommentere det. Kommissionen bør derefter træffe en afgørelse.

(90) Regelmæssige rapporter fra medlemsstaterne og agenturet om, hvorledes denne forordning fungerer, vil udgøre et absolut nødvendigt middel til at overvåge gennemførelsen af kemikalielovgivningen samt udviklingstendenser inden for området. Konklusioner på grundlag af rapporterne vil udgøre nyttige og praktiske værktøjer ved en revision af forordningen og udformningen af eventuelle forslag til ændringer af denne.

(91) Fællesskabets borgere bør havde adgang til oplysninger om kemikalier, som de kan blive eksponeret for, således at de kan træffe kvalificerede beslutninger vedrørende brug af kemikalier. En gennemskuelig metode til opnåelse af dette, vil være at give dem adgang til ikke-fortrolige oplysninger i agenturets database, herunder kortfattede profiler af de farlige egenskaber, etiketteringskrav og relevant fællesskabslovgivning, inklusive godkendte anvendelser og risikostyringsforanstaltninger.

(92) Ud over deres deltagelse i gennemførelsen af fællesskabslovgivningen bør medlemsstaternes kompetente myndigheder, fordi de er tættest på interessenterne i medlemsstaterne, spille en rolle i formidlingen af oplysninger om stoffers risici og om virksomhedernes forpligtelser som følge af kemikalielovgivningen. Samtidig er det nødvendigt med et tæt samarbejde mellem agenturet, Kommissionen og medlemsstaternes kompetente myndigheder for at sikre kohærens og effektivitet i den samlede kommunikationsproces.

(93) For at det system, der etableres med denne forordning, kan fungere effektivt, skal der være et godt samarbejde og en koordination mellem medlemsstaterne, agenturet og Kommissionen med hensyn til håndhævelse.

(94) For at sikre overholdelse af denne forordning bør medlemsstaterne træffe foranstaltninger til effektiv overvågning og kontrol.

(95) For at sikre åbenhed, upartiskhed og konsistens i graden af håndhævelsesaktiviteter i medlemsstaterne er det nødvendigt at etablere passende rammer for sanktioner med henblik på at fastsætte afskrækkende og effektive sanktioner for overtrædelser, der står

i rimeligt forhold til overtrædelsen, idet overtrædelse kan være til skade for menneskers sundhed og miljøet.

(96) De nødvendige inspektioner bør planlægges og udføres, og deres resultater bør rapporteres.

(97) De foranstaltninger, der er nødvendige for gennemførelsen af denne forordning og visse ændringer af denne bør vedtages i henhold til Rådets afgørelse 1999/468/EF af 28. juni 1999 om fastsættelse af de nærmere vilkår for udøvelsen af de gennemførelsesbeføjelser, der tillægges Kommissionen[17].

(98) Det er af afgørende betydning, at kemikalier reguleres effektivt og rettidigt i overgangsperioden, indtil bestemmelserne i denne forordning finder fuld anvendelse og især i agenturets opstartsfase. Der bør derfor fastsættes bestemmelser, så Kommissionen kan opfylde agenturets funktioner i det mindste i opstartsfasen. Kommissionen bør, om nødvendigt, kunne udnævne en midlertidig administrerende direktør, indtil agenturets bestyrelse selv kan udnævne en administrerende direktør.

(99) For fuldt ud at udnytte det arbejde, der er udført under forordning (EØF) nr. 793/93 samt under direktiv 76/769/EØF, og for at undgå at dette arbejde går til spilde, bør Kommissionen have beføjelser til i opstartsfasen at igangsætte begrænsninger baseret på sådant arbejde, uden fuldt ud at følge den begrænsningsprocedure, der er fastlagt i nærværende forordning.

(100) Det er hensigtsmæssigt, at nærværende forordnings bestemmelser træder i kraft i flere trin for at lette overgangen til det nye system. En gradvis ikrafttrædelse af bestemmelserne bør give de involverede parter, myndighederne, virksomhederne og interessenterne mulighed for at anvende ressourcer til forberedelse opfyldelsen af nye forpligtelser på de rette tidspunkter.

(101) Med denne forordning ophæves direktiv 76/769/EØF, Rådets direktiv 91/157/EØF af 18. marts 1991 om batterier og akkumulatorer, der indeholder farlige stoffer[18], Kommissionens direktiv 93/67/EØF af 20. juli 1993 om fastsættelse af principperne for vurderingen af risikoen for mennesker og miljøet ved stoffer, der anmeldes i overensstemmelse med Rådets direktiv 67/548/EØF[19]„ Kommissionens direktiv 93/105/EF af 25. november 1993 om fastlæggelse af det tekniske oplysningsmateriale i bilag VII D, jf. artikel 12 i den syvende ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF[20] Kommissionens direktiv 2000/21/EF af 25. april 2000 om den fortegnelse over fællesskabsregler, der er omhandlet i artikel 13, stk. 1, femte led, i Rådets direktiv 67/548/EØF[21], forordning (EF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr.1488/94 af 28. juni 1994 om principperne for vurdering af risikoen for mennesker og miljø ved eksisterende stoffer, i overensstemmelse med Rådets direktiv (EØF) nr. 793/93[22].

---

17 EFT L 184 af 17.7.1999, s. 23.

18 EFT L 78 af 26.3.1991, s. 38. Direktivet er senest ændret ved Kommissionens direktiv 98/101/EF (EFT L 1 af 5.1.1999, s. 1).

19 EFT L 227 af 8.9.1993, s. 9.

20 EFT 294 af 30.11.1993, s. 21.

21 EFT L 103 af 28.4.2000, s. 70.

22 EFT L 161 af 29.6.1994, s. 3.

(102) Af hensyn til konsekvensen bør forordning (EF) nr. .../... {forordningen om POP-stoffer}[23], som allerede dækker spørgsmål, der er omfattet af nærværende forordning, ændres, og det samme gælder direktiv 1999/45/EF.

(103) I overensstemmelse med proportionalitetsprincippet er det nødvendigt og hensigtsmæssigt for opnåelse af de grundlæggende mål med denne forordning at fastlægge regler for kemiske stoffer og oprette et europæisk kemikaliekontor. I overensstemmelse med traktatens artikel 5, stk. 3, går denne forordning ikke ud over, hvad der er nødvendigt for at nå disse mål.

(104) Nærværende forordning overholder de grundlæggende rettigheder og de principper, der bl.a. er fastlagt i Den Europæiske Unions charter om grundlæggende rettigheder[24]. Navnlig søger den at sikre fuld overensstemmelse med principperne om miljøbeskyttelse og bæredygtig udvikling, der omhandles i charterets artikel 37 -

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

AFSNIT I
GENERELLE SPØRGSMÅL

KAPITEL 1
INDHOLD OG ANVENDELSESOMRÅDE

Artikel 1
Formål

1. Denne forordning fastlægger bestemmelser om stoffer i betydningen i artikel 3, stk. 1. Disse bestemmelser finder anvendelse på fremstilling, import, markedsføring eller anvendelse af sådanne stoffer alene, i præparater eller i artikler, hvis dette er anført.

2. Formålet med denne forordning er at sikre den frie bevægelighed for sådanne stoffer i det indre marked.

3. Denne forordning bygger på princippet om, at det er op til producenter, importører og downstream-brugere at sikre, at de fremstiller, markedsfører, importerer eller anvender sådanne stoffer, der ikke skader menneskers sundhed eller miljøet. Bestemmelserne i forordningen bygger på forsigtighedsprincippet[25].

---

23 EFT L

24 EFT C 364 af 18.12.2000, s. 1.

25 Som omhandlet i Kommissionens meddelelse om forsigtighedsprincippet, KOM(2000) 1, endelig.

Artikel 2
Anvendelsesområde

1. Denne forordning gælder ikke for:

   (a) radioaktive stoffer, som falder ind under Rådets direktiv 96/29/Euratom[26]

   (b) stoffer alene, i et præparat eller i en artikel, som er underkastet toldkontrol, for så vidt de ikke er genstand for nogen behandling eller forarbejdning, og som er midlertidigt oplagret eller befinder sig i en frizone eller på et frilager med henblik på reeksport, eller i transit.

   (c) ikke-isolerede mellemprodukter.

2. Denne forordning berører ikke:

   (a) Rådets direktiv 89/391/EØF[27]

   (b) direktiv 90/394/EØF

   (c) Rådets direktiv 98/24/EØF[28]

   (d) fællesskabslovgivningen om transport af farlige stoffer og farlige stoffer i præparater med jernbane, ad vej og indre vandveje eller ad sø- eller luftvejen.

KAPITEL 2
DEFINITIONER

Artikel 3
Definitioner

I denne forordning forstås ved:

1. *Stof*: et grundstof og forbindelser heraf, naturligt eller industrielt fremstillet, indeholdende sådanne tilsætningsstoffer, som er nødvendige til bevarelse af stoffets stabilitet, og sådanne urenheder, som følger af fremstillingsprocessen, bortset fra opløsningsmidler, som kan udskilles, uden at det påvirker stoffets stabilitet eller ændrer dets sammensætning.

2. *Præparat*: blandinger eller opløsninger, der er sammensat af to eller flere stoffer.

3. *Artikel*: en genstand, som består af et eller flere stoffer eller præparater, og som under fremstillingen har fået en bestemt form, overflade eller beskaffenhed, som har større betydning for dens endelige funktion, end dens kemiske sammensætning har.

---

[26] EFT L 159 af 29.6.1996, s. 1.
[27] EFT L 183 af 29.6.1989, s. 1.
[28] EFT L 131 af 5.5.1998, s. 11.

4. *Polymer*: et stof bestående af molelkyler, der er karakteriseret ved sammenkobling af en eller flere typer monomere enheder. Sådanne molekyler skal være fordelt på en række molekylvægte, inden for hvilke forskellene i molekylvægt hovedsagelig skyldes forskelle i antallet af monomere enheder. En polymer omfatter følgende:

   (a) et simpelt vægtflertal af molekyler, der indeholder mindst tre monomere enheder, som er kovalent bundet til mindst en anden monomer enhed eller anden reaktant

   (b) mindre end et simpelt vægtflertal af molekyler med samme molekylvægt.

   I denne definition forstås ved en "monomer enhed" en monomers form i en polymer efter reaktionen.

5. *Registrant*: den producent eller importør, der indsender en registrering.

6. *Fremstilling*: produktion og udvinding af stoffer i naturlig tilstand.

7. *Producent*: enhver fysisk eller juridisk person etableret i Fællesskabet, der fremstiller et stof inden for Fællesskabet.

8. *Import*: fysisk indførelse i Fællesskabets toldområde.

9. *Importør:* enhver fysisk eller juridisk person etableret i Fællesskabet, der er ansvarlig for import.

10. *Markedsføring*: levering til eller tilrådighedsstillelse for tredjemand mod betaling eller vederlagsfrit. Import til Fællesskabets toldområde betragtes som markedsføring.

11. *Downstream-bruger:* enhver fysisk eller juridisk person etableret i Fællesskabet, bortset fra producenten eller importøren, som anvender et stof, enten alene eller i et præparat, som led i hans industrielle eller erhvervsmæssige aktiviteter. En distributør eller en forbruger er ikke en downstream-bruger. En reimportør, der er undtaget i henhold til artikel 4, stk. 2, litra c), anses for at være en downstream-bruger.

12. *Anvendelse:* enhver form for forarbejdning, anvendelse i præparater, opbevaring, behandling, påfyldning i beholdere, overførsel fra en beholder til en anden, blanding, fremstilling af en artikel eller enhver anden brug.

13. *Distributør:* enhver fysisk eller juridisk person etableret i Fællesskabet, herunder en detailhandler, som kun opbevarer og markedsfører et stof alene eller i et præparat for tredjeparter.

14. *Mellemprodukt:* et stof der udelukkende fremstilles til eller forbruges i eller anvendes til kemisk forarbejdning for at blive transformeret til et andet stof (herefter benævnt *syntese*):

   (a) Ikke-isoleret mellemprodukt*:* et mellemprodukt, som under syntesen ikke bevidst fjernes (bortset fra prøveudtagning) fra det udstyr, som syntesen finder sted i. I sådant udstyr indgår reaktionsbeholderen, hjælpeudstyr hertil, samt udstyr, som stoffet/stofferne passerer igennem i en ubrudt strøm eller batchproces, og rørsystemer til overførsel fra en beholder til en anden med

henblik på næste reaktionstrin, men det omfatter ikke tanke eller andre beholdere, som stoffet/stofferne opbevares i efter fremstillingen.

(b) *På stedet isoleret mellemprodukt:* et mellemprodukt, der ikke opfylder kriterierne for et ikke-isoleret mellemprodukt, og hvor fremstillingen af mellemproduktet og syntesen af et eller flere andre stoffer fra dette mellemprodukt finder sted på samme sted, der drives af en eller flere juridiske enheder.

(c) *Transporteret isoleret mellemprodukt*: et mellemprodukt, der ikke opfylder kriterierne for et ikke-isoleret mellemprodukt, og som transporteres mellem eller leveres til andre steder.

15. *Sted*: en enkelt lokalitet, hvor visse infrastrukturer og anlæg deles, hvis der er mere end én producent af et eller flere stoffer.

16. *Aktører i forsyningskæden:* alle producenter og/eller importører og/eller downstream-brugere.

17. *Kommunikation nedad i forsyningskæden:* hver aktør i forsyningskæden kommunikerer til den downstream-bruger, som han leverer et stof til.

18. *Kommunikation opad i forsyningskæden:* en downstream-bruger kommunikerer til den aktør i forsyningskæden, som har leveret et stof til ham.

19. *Kompetent myndighed:* den eller de myndigheder eller organer, der er oprettet af medlemsstaterne for at opfylde de forpligtelser, der følger af denne forordning.

20. *Indfasningsstof*: et stof, som i den periode på 15 år, der ligger forud for denne forordnings ikrafttrædelse, opfylder mindst ét af følgende kriterier:

(a) det er blevet fremstillet i eller importeret til Fællesskabet eller de lande, der tiltræder Den Europæiske Union den 1. maj 2004, af en producent eller importør, og det indgår i den europæiske fortegnelse over eksisterende kemiske stoffer EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances),

(b) det er blevet fremstillet i Fællesskabet eller de lande, der tiltræder Den Europæiske Union den 1. maj 2004, men er ikke blevet markedsført af producenten eller importøren,

(c) det er blevet markedsført i Fællesskabet eller de lande, der tiltræder Den Europæiske Union den 1. maj 2004, og mellem den 18. september 1981 og den 31. oktober 1993 inkl. er det også blevet markedsført af producenten eller importøren, og det blev anset for at være anmeldt i overensstemmelse med artikel 8, stk. 1, første led, i direktiv 67/548/EØF, som ændret ved direktiv 79/831/EØF[29], men svarer ikke til definitionen af en polymer i direktiv 67/548/EØF, som ændret ved 92/32/EØF[30],

---

29 EFT L 259 af 15.10.1979, s. 10.

30 EFT L 154 af 5.6.1992, s. 1.

forudsat at producenten eller importøren kan dokumentere dette.

21. *Anmeldt stof*: et stof for hvilket der er indsendt en anmeldelse, og som kunne markedsføres i overensstemmelse med direktiv 67/548/EØF.

22. *Produkt- og procesorienteret forskning og udvikling:* enhver form for videnskabelig udvikling relateret til produktudvikling eller videreudvikling af et stof, hvorunder pilotanlæg eller fremstillingsforsøg anvendes til at udvikle produktionsprocessen og/eller teste stoffets anvendelsesområder.

23. *Videnskabelig forskning og udvikling:* enhver form for videnskabelige forsøg, analyser eller kemisk forskning udført under kontrollerede betingelser i mængder på mindre end 1 ton pr. år.

24. *Registrantens egen brug:* anvendes industrielt eller erhvervsmæssigt af registranten.

25. *Identificeret anvendelse*: en anvendelse af et stof alene eller i et præparat, eller en anvendelse af et præparat, der er en tilsigtet anvendelse fastlagt af en aktør i forsyningskæden, herunder hans egen anvendelse, eller som han er blevet underrettet skriftligt om af en downstream-bruger umiddelbart under ham i forsyningskæden, og som er omfattet af det sikkerhedsdatablad, som den pågældende downstream-bruger har modtaget.

26. *Uønsket anvendelse:* en anvendelse hos downstream-brugerne, som registranten fraråder.

27. *Fyldigt undersøgelsesresumé:* et detaljeret resumé af en fuldstændig undersøgelsesrapports mål, metoder, resultater og konklusioner med tilstrækkelige oplysninger til at man kan foretage en uafhængig vurdering af undersøgelsen og derved reducere behovet for at konsultere den fuldstændige undersøgelsesrapport mest muligt.

28. *Pr. år:* pr. kalenderår, medmindre andet er angivet.

29. *Begrænsning*: enhver betingelse for eller forbud mod fremstilling, anvendelse eller markedsføring.

AFSNIT II
REGISTRERING AF STOFFER

KAPITEL 1
ANVENDELSESOMRÅDE

Artikel 4
Anvendelsesområde

1. Bestemmelserne i dette afsnit finder ikke anvendelse i det omfang, at stoffet anvendes:

(a) til human- og veterinærmedicinske lægemidler i betydningen i Rådets forordning (EØF) nr. 2309/93, Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/82/EF[31] og Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/83/EF[32]

(b) som et tilsætningsstof i levnedsmidler, som falder ind under Rådets direktiv 89/107/EØF[33]

(c) som et aromastof i levnedsmidler, som falder ind under Kommissionens afgørelse 1999/217/EF[34]

(d) som et tilsætningsstof til foderstoffer i betydningen i Rådets direktiv 70/524/EØF[35]

(e) i foderstoffer i betydningen i Rådets direktiv 82/471/EØF[36].

2. Følgende undtages fra bestemmelserne i dette afsnit:

(a) stoffer optaget i bilag II

(b) stoffer omfattet af bilag III

(c) stoffer alene eller i præparater, der er registreret i overensstemmelse med dette afsnit, og eksporteret fra Fællesskabet af en aktør i forsyningskæden og reimporteret til Fællesskabet af en anden aktør i den samme forsyningskæde, som påviser, at:

(i) det stof, der reimporteres, er det samme som det eksporterede stof

(ii) han har modtaget oplysningerne i henhold til artikel 30 og 31 vedrørende det eksporterede stof.

3. På stedet isolerede mellemprodukter eller transporterede isolerede mellemprodukter undtages fra bestemmelserne i kapitel 2 og 3, dog med forbehold af bestemmelserne i kapitel 4, 5 og 6.

---

31 EFT L 311 af 28.11.2001, s. 1.
32 EFT L 311 af 28.11.2001, s. 67.
33 EFT L 40 af 11.2.1989, s. 27.
34 EFT L 84 af 27.3.1999, s. 1.
35 EFT L 270 af 14.12.1970, s. 1.
36 EFT L 213 af 21.7.1982, s. 8.

KAPITEL 2
GENEREL FORPLIGTELSE TIL AT FORETAGE REGISTRERING SAMT OPLYSNINGSKRAV

Artikel 5

Generel forpligtelse til at registrere stoffer alene eller i præparater

1. Medmindre andet er fastlagt i denne forordning, indsender enhver producent, der fremstiller et stof i mængder på 1 ton eller mere pr. år, en registrering til agenturet.

   Medmindre andet er fastlagt i denne forordning, indsender enhver importør af et stof alene eller i et præparat i mængder på 1 ton eller mere pr. år en registrering til agenturet.

2. For monomerer, der anvendes som på stedet isolerede mellemprodukter eller transporterede isolerede mellemprodukter, finder artikel 15 og 16 ikke anvendelse.

3. Enhver producent eller importør af en polymer indsender en registrering til agenturet for det/de ikke-registrerede monomere stoffer eller andet/andre ikke-registrerede stoffer, hvis begge nedenstående betingelser er opfyldt:

   (a) polymeren består af 2 vægtprocent (w/w) eller mere af sådant/sådanne monomere stoffer eller andet/andre stoffer

   (b) den samlede mængde af sådant/sådanne monomere stoffer eller andet/andre stoffer udgør 1 ton eller mere pr. år.

4. En indsendelse med anmodning og registrering indsendes til agenturet sammen med det af agenturet fastsatte gebyr.

Artikel 6

Generel forpligtelse til at registrere stoffer i artikler

1. Enhver producent eller importør af artikler indsender en registrering til agenturet for ethvert stof indeholdt i disse artikler, hvis alle de følgende betingelser er opfyldt:

   (a) stoffet er til stede i disse artikler i mængder på over 1 ton pr. producent eller importør pr. år, idet hver artikel betragtes separat

   (b) stoffet opfylder kriterierne for klassificering som farligt i henhold til direktiv 67/548/EØF

   (c) stoffet er beregnet til at blive frigivet under normale og med rimelighed forudsigelige anvendelsesbetingelser.

2. Enhver producent eller importør af artikler anmelder ethvert stof indeholdt i disse artikler til agenturet i overensstemmelse med stk. 3, hvis alle de følgende betingelser er opfyldt:

(a) stoffet er til stede i disse artikler i mængder på over 1 ton pr. producent eller importør pr. år

(b) stoffet opfylder kriterierne for klassificering som farligt i henhold til direktiv 67/548/EØF

(c) producenten eller importøren ved, eller producenten eller importøren underrettes om, at stoffet sandsynligvis vil blive frigivet under normale og med rimelighed forudsigelige anvendelsesbetingelser, også selv om sådan frigivelse ikke er en tilsigtet funktion for artiklen

(d) den mængde af stoffet, der frigives, kan skade menneskers sundhed eller miljøet.

3. Hvis betingelserne i stk. 2 er opfyldt, skal de oplysninger, der anmeldes, omfatte følgende i det af agenturet i henhold til artikel 108 fastlagte format:

(a) producenten eller importørens identitet og oplysninger om, hvorledes disse kan kontaktes

(b) det eller de i artikel 18, stk. 1, omhandlede registreringsnumre, hvis sådant eller sådanne foreligger

(c) stoffets/stoffernes identitet, som angivet i punkt 2 i bilag IV

(d) stoffets klassificering

(e) en kort beskrivelse af artiklens anvendelse/anvendelser

(f) stoffets tonnageområde, f.eks. 1-10 tons, 10-100 tons osv.

4. Agenturet kan træffe afgørelser, der kræver, at producenter eller importører af artikler i overensstemmelse med dette afsnit registrerer ethvert stof indeholdt i disse artikler og anmeldt i overensstemmelse med stk. 3.

5. Stk. 1 til 4 finder ikke anvendelse på stoffer, der allerede er registreret til den pågældende anvendelse af en aktør længere oppe i forsyningskæden.

6. Stk. 1 til 4 finder anvendelse 3 måneder efter den frist, der er fastsat i artikel 21, stk. 3.

7. Foranstaltninger til gennemførelse af stk. 1 til 6 vedtages i overensstemmelse med proceduren i artikel 130, stk. 3.

Artikel 6a

Enerepræsentant for en producent fra et tredjeland

1. En fysisk eller juridisk person etableret uden for Fællesskabet, som fremstiller et stof, der importeres til Fællesskabet alene, i præparater eller i artikler kan ved gensidig aftale udpege en fysisk eller juridisk person etableret i Fællesskabet til som hans enerepræsentant at opfylde de forpligtelser, der er pålagt importører i henhold til dette afsnit.

2. Denne repræsentant skal også opfylde alle de andre forpligtelser pålagt importører i henhold til denne forordning. Med henblik herpå skal han have en tilstrækkelig baggrund med hensyn til håndtering af stoffer og de oplysninger, der vedrører dem, og han skal, uden at dette berører bestemmelserne i artikel 33, kunne stille ajourførte oplysninger til rådighed om de importerede mængder, og hvilke kunder der er solgt til, samt oplysninger om levering af den seneste ajourføring af sikkerhedsdatabladet.

3. Hvis en repræsentant udpeges i henhold til stk. 1 og 2, underretter eksportøren fra tredjelandet importøren/importørerne i samme forsyningskæde om en sådan udpegelse. Disse importører betragtes for så vidt angår denne forordning som downstream-brugere.

Artikel 7

Undtagelser fra den generelle forpligtelse til at foretage registrering for produkt- og procesorienteret forskning og udvikling (Ppord)

1. Artikel 5 og 19 finder i en periode på 5 år ikke anvendelse på et stof fremstillet i Fællesskabet eller importeret med henblik på anvendelse til procesorienteret forskning og udvikling af et antal registrerede kunder i en mængde, som er begrænset til anvendelse til procesorienteret forskning og udvikling.

2. For så vidt angår stk. 1 anmelder producenten eller importøren følgende oplysninger til agenturet i det af agenturet i henhold til artikel 108 fastlagte format:

   (a) producenten eller importørens identitet

   (b) stoffets identitet

   (c) stoffets eventuelle klassificering

   (d) den anslåede mængde

   (e) listen over kunder som omhandlet i stk. 1 og

   (f) tilstrækkelige oplysninger om forsknings- og udviklingsprogrammet til at agenturet kan træffe kvalificerede afgørelser i henhold til stk. 4 og 7.

   Den periode, der er fastsat i stk. 1, begynder ved agenturets modtagelse af anmeldelsen.

3. Agenturet tildeler anmeldelsen et nummer og en anmeldelsesdato, som er den dato, hvor agenturet modtog anmeldelsen, og meddeler straks den pågældende producent eller importør dette nummer og denne dato.

4. Agenturet kontrollerer, at de oplysninger, som modtages fra anmelderen, er fuldstændige. Det kan beslutte at fastsætte betingelser med det formål at sikre, at stoffet eller præparatet eller den artikel, som stoffet er inkorporeret i, kun vil blive håndteret af personale hos kunder som omhandlet i stk. 2, litra e, under med rimelighed kontrollerede betingelser, og at det ikke på noget tidspunkt vil blive gjort tilgængeligt for offentligheden, hverken alene eller i et præparat eller i en artikel, og at tiloversblevne mængder vil blive indsamlet til bortskaffelse efter undtagelsesperioden.

5. Medmindre andet angives, kan stoffets producent eller importør tidligst fremstille eller importere stoffet fire uger efter anmeldelsen.

6. Producenten eller importøren skal overholde alle betingelser pålagt af agenturet i overensstemmelse med stk. 4.

7. Agenturet kan beslutte at forlænge udtagelsesperioden på 5 år med højst 5 år mere, hvis der er tale om stoffer, der udelukkende skal anvendes til udvikling af human- og veterinærmedicinske lægemidler, og med højst 10 år mere efter anmodning, hvis producenten eller importøren kan påvise, at en sådan forlængelse er berettiget ud fra forsknings- og udviklingsprogrammet.

8. Agenturet fremsender straks eventuelle udkast til afgørelser til de kompetente myndigheder i hver af de medlemsstater, hvor fremstillingen, importen eller den produkt- og procesorienterede forskning finder sted.

   Når det træffer afgørelse i henhold til stk. 4 og 7, tager agenturet hensyn til eventuelle kommentarer fremsat af sådanne kompetente myndigheder.

9. Agenturet og de kompetente myndigheder i de respektive medlemsstater behandler altid oplysninger indsendt i henhold til stk. 1 til 8 fortroligt.

10. Agenturets afgørelser truffet i henhold til stk. 4 og 7 kan appelleres i henhold til bestemmelserne i artikel 87, 88 og 89.

Artikel 8

Stoffer i plantebeskyttelsesmidler og biocidholdige produkter

1. Aktive stoffer, der er fremstillet eller importeret udelukkende til anvendelse i plantebeskyttelsesmidler, og som er optaget enten i bilag I til Rådets direktiv 91/414/EØF[37] eller i Kommissionens forordning (EØF) nr. 3600/92[38], Kommissionens forordning (EF) nr. 703/2001[39], Kommissionens forordning (EF) nr. 1490/2002[40] eller Kommissionens beslutning 2003/565/EF[41], og

---

37 EFT L 230 af 19.8.1991, s. 1.
38 EFT L 366 af 15.12.1992, s. 10.
39 EFT L 98 af 7.4.2001, s. 6.
40 EFT L 224 af 21.8.2002, s. 23.
41 EUT L 192 af 31.7.2003, s. 40.

ethvert stof for hvilket Kommissionen har truffet en afgørelse vedrørende dossierets fuldstændighed i henhold til artikel 6 i direktiv 91/414/EØF, anses for at være registrerede for så vidt angår fremstilling eller import til de anvendelser, der er omfattet af en sådan optagelse, og derfor for at opfylde kravene i dette kapitel og i artikel 20.

2. Aktive stoffer fremstillet eller importeret udelukkende til brug i biocidholdige produkter og optaget enten i bilag I, IA eller IB til Europa-Parlamentet og Rådets direktiv 98/8/EF[42] eller i Kommissionens forordning (EF) nr. .../...{Second Review Regulation[43]} indtil datoen for den afgørelse, der er omhandlet i artikel 16, stk. 2, andet afsnit, i direktiv 98/8/EF, anses for at være registrerede for så vidt angår fremstilling eller import til de anvendelser, der er omfattet af en sådan optagelse, og derfor for at opfylde kravene i dette kapitel og i artikel 20.

Artikel 9

Oplysninger, der skal indsendes ved den generelle registrering

En registrering, der kræves i henhold til artikel 5 eller artikel 6, stk. 1 eller 4, skal omfatte følgende oplysninger i det af agenturet i henhold til artikel 108 fastlagte format:

(a) et teknisk dossier omfattende:

(i) producentens/producenternes eller importørens/importørernes identitet, som angivet i punkt 1 i bilag IV

(ii) stoffets/stoffernes identitet, som angivet i punkt 2 i bilag IV

(iii) oplysninger om stoffets fremstilling og anvendelse/anvendelser, som angivet i punkt 3 i bilag IV; disse oplysninger skal omfatte alle registrantens identificerede anvendelser

(iv) stoffets klassificering og etikettering, som angivet i punkt 4 i bilag IV

(v) vejledning i sikker brug af stoffet, som nærmere angivet i punkt 5 i bilag IV

(vi) resuméer af de oplysninger, der stammer fra anvendelsen af bilag V til IX

(vii) fyldige undersøgelsesresuméer af de oplysninger, der stammer fra anvendelsen af bilag V til IX, hvis dette kræves i henhold til bilag I

(viii) en erklæring om, hvorvidt oplysninger er frembragt ved forsøg med hvirveldyr

(ix) forslag til forsøg, hvis dette er påkrævet ved anvendelse af bilag V til IX

(x) en erklæring om hvorvidt han accepterer, at hans resuméer og fyldige undersøgelsesresuméer af de oplysninger, der stammer fra anvendelsen af bilag V til VIII med hensyn til forsøg, hvori ikke indgår hvirveldyr, mod betaling kan deles med efterfølgende registranter

---

42 EFT L 123 af 24.4.1998, s. 1.

43 EUT L

(b) en kemisk sikkerhedsrapport, når dette kræves i henhold til artikel 13.

Artikel 10

Fælles indsendelse af data af deltagere i konsortier

1. Når det er hensigten, at et stof skal fremstilles i Fællesskabet af to eller flere producenter og/eller importeres af to eller flere importører, kan de danne et konsortium med henblik på registreringen. Dele af registreringen indsendes så af én producent eller importør, der med deres accept handler på vegne af andre producenter og/eller importører i overensstemmelse med andet, tredje og fjerde afsnit.

   Hver deltager i konsortiet indsender separat de oplysninger, der er angivet i artikel 9, litra a), nr. (i), (ii) og (iii) samt (viii).

   Den producent eller importør, der indsender på vegne af de andre deltagere i konsortiet, indsender de oplysninger, der er nærmere angivet i artikel 9, litra a), nr. (iv), (vi), (vii) og (ix).

   Deltagerne i konsortiet beslutter selv, om de vil indsende de oplysninger, der er nærmere angivet i artikel 9, litra a) (v) og litra b), separat, eller om den ene producent eller importør indsender disse oplysninger på vegne af de andre.

2. Hver registrant, der deltager i et konsortium, betaler kun en tredjedel af registreringsgebyret.

Artikel 11

Oplysninger, der skal indsendes afhængig af mængde

1. Det tekniske dossier, der er omhandlet i artikel 9, litra a), skal med hensyn til nr. (vi), (vii) og (viii) mindst omfatte følgende:

   (a) de oplysninger, der er nærmere angivet i bilag V, for stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på 1 ton eller mere pr. år pr. producent eller importør

   (b) de oplysninger, der er nærmere angivet i bilag V og VI, for stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på 10 tons eller mere pr. år pr. producent eller importør

   (c) de oplysninger, der er nærmere angivet i bilag V, VI, samt forslag til forsøg til fremskaffelse af de oplysninger, der er angivet i bilag VII, for stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på 100 tons eller mere pr. år pr. producent eller importør

   (d) de oplysninger, der er nærmere angivet i bilag V, VI, samt forslag til forsøg til fremskaffelse af de oplysninger, der er angivet i bilag VII og VIII, for stoffer, der fremstilles eller importeres i mængder på 1 000 tons eller mere pr. år pr. producent eller importør.

2. Så snart den mængde af et stof, der allerede er registreret, når op på den efterfølgende tonnagegrænseværdi, indsendes de yderligere oplysninger, som er påkrævede i henhold til stk. 1, samt ajourføringer af andre elementer af registreringen set i lyset af disse yderligere oplysninger, til agenturet.

Artikel 12

Generelle krav til generering af oplysninger om stoffers iboende egenskaber

1. Oplysninger om stoffers iboende egenskaber kan genereres på anden måde end ved forsøg, især ved anvendelse af modeller for kvantitative eller kvalitative struktur-aktivitet relationer på grundlag af oplysninger om strukturelt beslægtede stoffer, under forudsætning af at betingelserne i bilag IX er opfyldt.

2. Hvis forsøg er påkrævet til generering af oplysninger om stoffers iboende egenskaber, udføres disse i henhold til de forsøgsmetoder, der er fastlagt i bilag X.

   Oplysninger om stoffers iboende egenskaber kan genereres i henhold til andre forsøgsmetoder, forudsat at betingelserne i bilag IX er opfyldt.

3. Laboratorieforsøg og analyser udføres efter de i direktiv 87/18/EØF fastsatte principper for god laboratoriepraksis og efter bestemmelserne i direktiv 86/609/EØF.

4. Hvis et stof allerede er registreret, er en ny registrant berettiget til at henvise til tidligere indsendte undersøgelser og forsøgsrapporter, herefter benævnt "undersøgelser", vedrørende samme stof, forudsat at han kan påvise, at stoffet, som han nu registrerer er, det samme som det tidligere registrerede, herunder med hensyn til renhed og arten af urenheder, og forudsat at han kan indsende en dataadgangstilladelse fra den tidligere registrant/de tidligere registranter, der giver tilladelse til brug af undersøgelserne.

   En ny registrant må dog ikke henvise til sådanne undersøgelser for at fremskaffe de oplysninger, der kræves i henhold til punkt 2 i bilag IV.

Artikel 13

Kemisk sikkerhedsrapport og
pligt til at anvende og anbefale risikobegrænsende foranstaltninger

1. Med forbehold af artikel 4 i direktiv 98/24/EF udføres en kemisk sikkerhedsvurdering, og der udarbejdes en kemisk sikkerhedsrapport, for alle stoffer, der skal registreres i henhold til dette kapitel, hvis registranten fremstiller eller importerer et sådant stof i mængder på 10 tons eller derover pr. år.

   Den kemiske sikkerhedsrapport skal dokumentere den kemiske sikkerhedsvurdering, der skal foretages i henhold til stk. 2 til 7 og bilag I, enten for hvert stof alene eller i et præparat eller for en gruppe af stoffer.

2. En kemisk sikkerhedsvurdering er ikke påkrævet for stoffer, der er til stede i et præparat, hvis stoffets koncentration i præparatet er mindre end det laveste af nedenstående:

(a) de relevante koncentrationer, der er fastsat i tabellen i artikel 3, stk. 3, i direktiv 1999/45/EF

(b) koncentrationsgrænserne i bilag I til direktiv 67/548/EØF

(c) de koncentrationsgrænser, der er fastsat i del B i bilag II til direktiv 1999/45/EF

(d) de koncentrationsgrænser, der er fastsat i del B i bilag III til direktiv 1999/45/EF

(e) de koncentrationsgrænser, der er anført i en aftalt indførelse af oplysninger i den fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer, der oprettes i henhold til afsnit X

(f) 0,1%, hvis stoffer opfylder kriterierne i bilag XII.

3. En kemisk sikkerhedsvurdering af et stof skal omfatte følgende trin:

(a) vurdering af risikoen for menneskers sundhed

(b) vurdering af risikoen for menneskers sundhed som følge af fysisk-kemiske egenskaber

(c) vurdering af risikoen for miljøet

(d) vurdering af PBT og vPvB.

4. Hvis producenten eller importøren som et resultat af udførelsen af trin (a) til (d) i stk. 3 konkluderer, at stoffet opfylder kriterierne for klassificering som et farligt stof i henhold til direktiv 67/548/EØF, eller vurderes at være et PBT- eller vPvB-stof, skal den kemiske sikkerhedsvurdering også omfatte følgende yderligere trin:

(a) eksponeringsvurdering

(b) risikokarakterisering.

Eksponeringsvurderingen og risikokarakteriseringen skal vedrøre alle producentens eller importørens identificerede anvendelser.

5. Det er ikke nødvendigt, at den kemiske sikkerhedsrapport omfatter vurderinger af risiciene for menneskers sundhed i forbindelse med følgende endelige anvendelser:

(a) i materialer bestemt til at komme i berøring med levnedsmidler i betydningen i Rådets direktiv 89/109/EØF[44]

(b) i kosmetiske midler i betydningen i Rådets direktiv 76/768/EØF[45].

6. Enhver producent eller importør identificerer og anvender passende foranstaltninger til på passende vis at håndtere de risici, der er identificerede i den kemiske

---

[44] EFT L 40 af 11.2.1989, s. 38.
[45] EFT L 262 af 27.9.1976, s. 169.

sikkerhedsvurdering, og hvor det er hensigtsmæssigt, anbefaler han disse foranstaltninger i de sikkerhedsdatablade, som han leverer i henhold til artikel 29.

7. Enhver producent eller importør, der skal gennemføre en kemisk sikkerhedsvurdering, skal gøre sin kemiske sikkerhedsrapport tilgængelig og holde den ajourført.

KAPITEL 3
REGISTRERING AF POLYMERER

Artikel 14
Polymerer

Polymerer er undtaget fra registrering i henhold til dette afsnit.

KAPITEL 4
FORPLIGTELSE TIL AT FORETAGE REGISTRERING SAMT OPLYSNINGSKRAV FOR BESTEMTE TYPER AF ISOLEREDE MELLEMPRODUKTER

Artikel 15
Registrering af på stedet isolerede mellemprodukter

1. Enhver producent, der fremstiller et på stedet isoleret mellemprodukt i mængder på 1 ton eller mere pr. år, indsender en registrering af det på stedet isolerede mellemprodukt til agenturet.

2. En registrering af et på stedet isoleret mellemprodukt skal omfatte alle følgende oplysninger i det format, der er fastlagt af agenturet i henhold til artikel 108, i det omfang producenten er i stand til at indsende dem uden at skulle udføre yderligere forsøg:

   (a) producentens identitet, som angivet i punkt 1 i bilag IV

   (b) mellemproduktets identitet, som angivet i punkt 2 i bilag IV

   (c) mellemproduktets klassificering

   (d) eventuelle eksisterende og foreliggende oplysninger om mellemproduktets fysisk-kemiske egenskaber og egenskaber, som kan påvirke menneskers sundhed eller miljøet.

Artikel 16

Registrering af transporterede isolerede mellemprodukter

1. Enhver producent eller importør af et transporteret isoleret mellemprodukt i mængder på 1 ton eller mere pr. år, indsender en registrering af det transporterede isolerede mellemprodukt til agenturet.

2. En registrering af et transporteret isoleret mellemprodukt skal omfatte alle følgende oplysninger i det format, der er fastlagt af agenturet i henhold til artikel 108:

   (a) oplysninger om producenten eller importøren, som angivet i punkt 1 i bilag IV

   (b) mellemproduktets identitet, som angivet i punkt 2 i bilag IV

   (c) mellemproduktets klassificering

   (d) eventuelle eksisterende og foreliggende oplysninger om mellemproduktets fysisk-kemiske egenskaber og egenskaber, som kan påvirke menneskers sundhed eller miljøet.

3. En registrering af et transporteret isoleret mellemprodukt i mængder på mere end 1 000 tons pr. år skal ud over de oplysninger, der kræves i henhold til stk. 2, omfatte de oplysninger, der er nærmere fastsat i bilag V.

   For så vidt angår generering af disse oplysninger finder artikel 12 anvendelse.

4. Stk. 2 og 3 finder kun anvendelse på transporterede isolerede mellemprodukter, hvis transporten af dem til andre steder finder sted under stram kontraktmæssig styring, herunder fremstilling som lønarbejde eller mod gebyr, og hvor syntesen af et eller flere andre stoffer fra dette mellemprodukt foregår på disse andre steder under følgende nøje kontrollerede betingelser:

   (a) stoffet skal opbevares strengt isoleret ved hjælp af tekniske midler i hele dets livscyklus, herunder fremstilling, transport (inkl. jernbanetransport, vejtransport, transport ad indre vandveje, sø- eller lufttransport og transport i rørledninger), rensning, rengøring og vedligeholdelse, prøveudtagning, analyse, lastning og losning af udstyr eller beholdere, affaldsbortskaffelse eller -rensning og oplagring

   (b) i tilfælde af potentiel eksponering, skal der findes procedure- og kontrolteknologier, som reducerer emission og den deraf følgende eksponering mest muligt

   (c) kun behørigt uddannet og autoriseret personale må håndtere stoffet

   (d) i tilfælde af rengørings- og vedligeholdelsesarbejder skal der anvendes særlige procedurer som f.eks. udrensning og udvaskning, før systemet åbnes og nogen får adgang til det

   (e) transportoperationer skal finde sted i overensstemmelse med kravene i direktiv 94/55/EF

(f) i tilfælde af uheld, og hvor der frembringes affald, skal der anvendes procedure- og/eller kontrolteknologier til at reducere emissioner og den deraf følgende eksponering mest muligt under rensnings- eller rengørings- og vedligeholdelsesprocedurer

(g) procedurerne for håndtering af stoffer skal være veldokumenterede og skal nøje overvåges af stedets operatør

(h) registranten skal have et produktforvaltningssystem og skal overvåge brugerne for at sikre overholdelse af de betingelser, der er anført i litra (a) til (g).

Hvis betingelserne anført i første afsnit ikke er opfyldt, skal registreringen omfatte de oplysninger, der er nærmere angivet i artikel 9.

Artikel 17
Fælles indsendelse af data af deltagere i konsortier

1. Når det er hensigten, at et på stedet isoleret mellemprodukt eller transporteret isoleret mellemprodukt skal fremstilles i Fællesskabet af to eller flere producenter og/eller importeres af to eller flere importører, kan de danne et konsortium med henblik på registreringen. Dele af registreringen indsendes så af én producent eller importør, der med deres accept handler på vegne af de andre producenter og/eller importører i overensstemmelse med andet og tredje afsnit.

   Hver deltager i konsortiet indsender separat de oplysninger, der er angivet i artikel 15, stk. 2, litra a) og b), og artikel 16, stk. 2, litra a) og b).

   Den producent eller importør, der indsender på vegne af de andre deltagere i konsortiet, indsender de oplysninger, der er nærmere angivet i artikel 15, stk. 2, litra c) og d), og artikel 16, stk. 2, litra c) og d), og stk. 3, hvor dette er relevant.

2. Hver registrant, der deltager i et konsortium, betaler kun en tredjedel af gebyret.

KAPITEL 5
FÆLLES BESTEMMELSER FOR ALLE REGISTRERINGER

Artikel 18
Agenturets forpligtelser

1. Agenturet tildeler hver registrering et nummer, der skal angives i al korrespondance vedrørende registreringen, samt en registreringsdato, som svarer til den dato, hvor agenturet modtog registreringen. Agenturet meddeler straks den pågældende producent eller importør registreringsnummer og registreringsdato.

2. Agenturet foretager senest 3 uger efter registreringsdatoen en fuldstændighedskontrol af hver registrering for at sikre, at de elementer, der er påkrævet i henhold til artikel 9 og 11 eller 15 og 16, foreligger. Hvis en registrering af indfasningsstoffer indsendes i løbet af den periode på 2 måneder, der ligger umiddelbart forud for den relevante frist i artikel 21, foretager agenturet kontrollen inden for 3 måneder efter den

pågældende frist. Fuldstændighedskontrollen omfatter ikke en vurdering af de indsendte data eller begrundelsers kvalitet eller fyldestgørende beskaffenhed.

Hvis en registrering er ufuldstændig, meddeler agenturet inden tre uger efter registreringsdatoen registranten, hvilke yderligere oplysninger der er nødvendige, for at registreringen er fuldstændig i henhold til nærværende afsnit, og fastsætter en rimelig frist for indsendelse af disse. Registranten indsender sådanne yderligere oplysninger til agenturet inden for den fastsatte frist. Agenturet bekræfter modtagelsesdatoen for yderligere oplysninger over for registranten. Agenturet foretager endnu en fuldstændighedskontrol med de yderligere indsendte oplysninger.

Agenturet afviser registreringen, hvis registranten ikke fuldstændiggør sin registrering inden for den fastsatte frist.

3. Agenturet videresender registreringsdossieret sammen med registreringsnummer, registreringsdato, resultatet af fuldstændighedskontrollen samt en eventuel anmodning om yderligere oplysninger og en frist herfor i henhold til stk. 2, andet afsnit, til den kompetente myndighed i den relevante medlemsstat inden 30 dage efter registreringsdatoen. Den relevante medlemsstat er den medlemsstat, hvor fremstillingen finder sted, eller hvor importøren er etableret.

Agenturet videregiver straks de eventuelle yderligere oplysninger indsendt af registranten til den kompetente myndighed i den relevante medlemsstat.

4. Agenturets afgørelser truffet i henhold til stk. 2 i denne artikel kan appelleres i overensstemmelse med bestemmelserne i artikel 87, 88 og 89.

Artikel 19

Fremstilling og import af stoffer

1. Med forbehold af artikel 21 må stoffer kun fremstilles i Fællesskabet eller importeres til Fællesskabet, hvis de er registreret i overensstemmelse med de relevante bestemmelser i dette afsnit.

En registrant kan, med forbehold af artikel 25, stk. 4, fjerde afsnit, påbegynde fremstillingen eller importen af et stof, hvis andet ikke angives af agenturet i henhold til artikel 18, stk. 2, inden tre uger efter registreringsdatoen.

I tilfælde af registreringer af indfasningsstoffer indsendt inden 2 måneder før den relevante frist i artikel 21, som omhandlet i artikel 18, stk. 2, kan en registrant fortsætte fremstillingen eller importen af stoffet i 3 måneder efter udløbet af den pågældende frist eller indtil agenturets eventuelle afvisning af registreringen, afhængigt af hvilken af disse begivenheder, der først indtræder.

2. Hvis agenturet har meddelt registranten, at han skal indsende yderligere oplysninger i henhold til artikel 18, stk. 2, andet afsnit, kan registranten påbegynde fremstillingen eller importen, hvis andet ikke angives af agenturet, 3 uger efter at agenturet har modtaget de yderligere oplysninger til fuldstændiggørelse af registreringen, med forbehold af artikel 25, stk. 4, fjerde afsnit.

3. Hvis en producent eller importør indsender dele af registreringen på vegne af andre producenter og/eller importører i henhold til bestemmelserne i artikel 10 eller 17, må

disse andre producenter og/eller importører først fremstille stoffet i Fællesskabet eller importere det efter udløbet at den tidsfrist, der er fastsat i denne artikels stk. 1 eller 2, og forudsat, at agenturet, der tager sig af registreringen af den ene producent eller importør, der handler på vegne af de andre, ikke har angivet andet.

4. Stk. 1, 2 og 3 finder anvendelse på på stedet isolerede mellemprodukter eller transporterede isolerede mellemprodukter.

Artikel 20
Andre forpligtelser, som påhviler registranterne

1. Efter registreringen er en registrant ansvarlig for på eget initiativ straks skriftligt at meddele agenturet følgende i det format, der er fastlagt af agenturet i henhold til artikel 108:

   (a) enhver ændring i hans status, som f.eks. producent eller importør, eller i hans identitet, som f.eks. navn eller adresse

   (b) enhver ændring i stoffet sammensætning, som anført i bilag IV

   (c) betydelige ændringer i de årlige eller samlede mængder, der fremstilles eller importeres af vedkommende

   (d) nye anvendelser, som stoffet fremstilles eller importeres til, og som vedkommende med rimelighed kan forventes at have fået kendskab til

   (e) signifikant ny viden om de risici, som stoffet indebærer for menneskers sundhed og/eller miljøet, og som han med rimelighed kan forventes at have fået kendskab til

   (f) enhver ændring i stoffets klassificering og etikettering

   (g) enhver ajourføring eller ændring af den kemiske sikkerhedsrapport.

   Agenturet videregiver disse oplysninger til den kompetente myndighed i den relevante medlemsstat.

2. I tilfælde omfattet af artikel 10 eller 17, fremsender hver registrant separat de i stk. 1, litra c), angivne oplysninger.

KAPITEL 6
OVERGANGSBESTEMMELSER FOR INDFASNINGSSTOFFER OG ANMELDTE STOFFER

Artikel 21
Særlige bestemmelser for indfasningsstoffer

1. Artikel 19 finder i en periode på 3 år efter denne forordnings ikrafttrædelse ikke anvendelse på følgende stoffer:

(a) indfasningsstoffer, som er klassificerede som kræftfremkaldende, mutagene eller reproduktionstoksiske i kategori 1 og 2 i henhold til direktiv 67/548/EØF, og som fremstilles i Fællesskabet eller importeres hertil i mængder på 1 ton eller mere pr. år pr. producent eller pr. importør mindst én gang efter denne forordnings ikrafttrædelse

(b) indfasningsstoffer, som fremstilles i Fællesskabet eller importeres hertil i mængder på 1 000 tons eller mere pr. år pr. producent eller pr. importør mindst én gang efter denne forordnings ikrafttrædelse.

2. Artikel 19 finder i en periode på 6 år efter denne forordnings ikrafttrædelse ikke anvendelse på indfasningsstoffer, som fremstilles i Fællesskabet eller importeres hertil i mængder på 100 tons eller mere pr. år pr. producent eller pr. importør mindst én gang efter denne forordnings ikrafttrædelse.

3. Artikel 19 finder i en periode på 11 år efter denne forordnings ikrafttrædelse ikke anvendelse på indfasningsstoffer, der fremstilles i Fællesskabet eller importeres hertil i mængder på 1 ton eller mere pr. år pr. producent eller pr. importør mindst én gang efter denne forordnings ikrafttrædelse.

Artikel 22
Anmeldte stoffer

1. En anmeldelse indgivet i overensstemmelse med direktiv 67/548/EØF anses for en registrering for så vidt angår dette afsnit, og agenturet tildeler et registreringsnummer senest et år efter denne forordnings ikrafttrædelse.

2. Hvis mængden af et anmeldt stof, der fremstilles eller importeres, pr. producent eller importør, når den efterfølgende tonnagegrænseværdi i henhold til artikel 11, fremsendes de yderligere oplysninger, der er påkrævet for denne højere grænseværdi samt alle de lavere grænseværdier i henhold til artikel 9 og 11, medmindre sådanne oplysninger allerede er indsendt i overensstemmelse med disse artikler.

AFSNIT III
DATADELING OG UNDGÅELSE AF UNØDVENDIGE FORSØG

KAPITEL 1
FORMÅL OG GENERELLE REGLER

Artikel 23
Formål og generelle regler

1. For at undgå unødvendige dyreforsøg må forsøg med hvirveldyr i forbindelse med denne forordning kun finde sted som en sidste udvej. Det er også nødvendigt at træffe foranstaltninger til begrænsning af unødvendig gentagelse af andre forsøg.

2. Deling og fælles indsendelse af oplysninger i overensstemmelse med denne forordning skal vedrøre tekniske data og især oplysninger vedrørende stoffers iboende egenskaber. Registranterne afstår fra at udveksle oplysninger om deres markedsadfærd, især om produktionskapacitet, produktions- eller salgstal, importmængder eller markedsandele.

3. Ethvert resumé eller fyldigt undersøgelsesresumé vedrørende undersøgelser indsendt inden for rammerne af en registrering mindst 10 år tidligere kan af agenturet frit stilles til rådighed for enhver anden registrant eller potentiel registrant.

4. For så vidt angår forsøg, hvori der ikke indgår hvirveldyr, finder dette afsnit kun anvendelse på potentielle registranter, hvis tidligere registranter har afgivet en positiv erklæring i henhold til artikel 9, litra a), nr (x).

KAPITEL 2
REGLER FOR IKKE-INDFASNINGSSTOFFER

Artikel 24
Pligt til at forespørge før registrering

1. Før forsøg med hvirveldyr udføres for at opfylde oplysningskravene i forbindelse med registrering, finder stk. 2, 3 og 4 anvendelse.

2. Den potentielle registrant skal konsultere den database, der er omhandlet i artikel 73, stk. 2, litra d), for at undersøge, om det samme stof allerede er registreret.

3. Den potentielle registrant forhører sig hos agenturet, om der allerede er indsendt en registrering for det samme stof. Sammen med forespørgslen indsender han følgende oplysninger til agenturet:

   (a) hans identitet

   (b) stoffets identitet, som angivet i punkt 2.1 og 2.3 i bilag IV

   (c) oplysninger om hvilke oplysningskrav, der vil kræve, at han udfører nye undersøgelser med hvirveldyr

   (d) oplysninger om, hvilke oplysningsskrav, der vil kræve, at han udfører andre nye undersøgelser.

4. Hvis det samme stof ikke tidligere er blevet registreret, underretter agenturet den potentielle registrant herom.

5. Hvis det samme stof allerede er blevet registreret mindre end 10 år tidligere, underretter agenturet straks den potentielle registrant om den eller de tidligere registranters navn og adresse, og om de relevante resuméer eller fyldige undersøgelsesresuméer af undersøgelserne, afhængigt af det enkelte tilfælde, som disse allerede har indsendt, og hvori indgår hvirveldyr.

   Disse undersøgelser må ikke gentages.

Agenturet underretter også den potentielle registrant om de relevante resuméer eller fyldige undersøgelsesresuméer af undersøgelserne, afhængigt af det enkelte tilfælde, som allerede er indsendt af de tidligere registranter, hvori ikke indgår hvirveldyr, og for hvilke de tidligere registranter har afgivet en positiv erklæring i overensstemmelse med artikel 9, litra a), nr. (x).

Agenturet underretter samtidig de tidligere registranter om den potentielle registrants navn og adresse.

6. Hvis en anden potentiel registrant har rettet forespørgsel samme stof, informerer agenturet straks begge de potentielle registranter om den anden potentielle registrants navn og adresse og om de undersøgelser med hvirveldyr, som kræves af hver af dem.

Artikel 25

Deling af eksisterende data mellem registranter

1. I tilfælde af stoffer der allerede er registreret mindre end 10 år tidligere, som omhandlet i artikel 24, stk. 5, anmoder den potentielle registrant den eller de tidligere registranter om de oplysninger, hvori indgår forsøg med hvirveldyr, som han har brug for for at kunne foretage en registrering. Han kan anmode registranterne om enhver form for oplysninger om forsøg, hvori der ikke indgår hvirveldyr, vedrørende hvilke tidligere registranter har afgivet en positiv erklæring i henhold til artikel 9, litra a), nr. (x).

2. Den potentielle og den eller de tidligere registranter af samme stof træffer alle rimelige foranstaltninger for at indgå en aftale om at dele undersøgelser, hvori indgår forsøg af hvilken som helst art, og om at stille disse undersøgelser til rådighed. I stedet for en sådan aftale kan sagen forelægges for en voldgiftsinstans, hvis afgørelse så accepteres.

3. Hvis der er indgået en aftale om deling af undersøgelser, giver den eller de tidligere registranter en dataadgangstilladelse til den potentielle registrant for de pågældende undersøgelser inden to uger efter modtagelse af betaling.

   Den nye registrant henviser til disse undersøgelser i sit registreringsdossier og indsender dataadgangstilladelsen fra den eller de tidligere registranter.

4. Hvis det ikke lykkes at nå frem til en sådan aftale, kan den potentielle registrant underrette agenturet og den eller de tidligere registranter herom senest 1 måned efter, at han fra agenturet har modtaget navn og adresse på den eller de tidligere registranter.

5. Den eller de tidligere registranter har 1 måned fra den i stk. 4 nævnte underretning til at underrette den potentielle registrant og agenturet om de omkostninger, som han eller de har pådraget sig i forbindelse med den pågældende undersøgelse. På anmodning af den potentielle registrant træffer agenturet afgørelse om at stille resuméerne eller de fyldige undersøgelsesresuméer af undersøgelserne, afhængigt af det enkelte tilfælde, eller resultaterne heraf til rådighed for ham efter modtagelse af dokumentation for, at han har betalt den eller de tidligere registranter 50% af de omkostninger, som de har godtgjort, at de har afholdt.

6. Hvis den eller de tidligere registranter ikke underretter den potentielle registrant og agenturet om sådanne omkostninger inden for den i stk. 5 fastsatte frist, træffer agenturet efter anmodning afgørelse om at stille resuméerne eller de fyldige undersøgelsesresuméer af de pågældende undersøgelser, afhængigt af det enkelte tilfælde, til rådighed for den potentielle registrant i overensstemmelse med dennes anmodning. Den eller de tidligere registranter har krav på godtgørelse af 50% af omkostningerne fra den potentielle registrant, og dette krav har retskraft ved de nationale domstole.

7. Agenturets afgørelser truffet i henhold til stk. 5 og 6 i denne artikel kan appelleres i overensstemmelse med bestemmelserne i artikel 87, 88 og 89.

8. Den frist, der er fastsat i henhold til artikel 19, stk. 1, for den nye registrant, forlænges med en periode på 4 måneder, hvis den tidligere registrant anmoder herom.

KAPITEL 3
REGLER FOR INDFASNINGSSTOFFER

Artikel 26
Forpligtelse til præregistrering af indfasningsstoffer

1. For at drage fordel af den overgangsordning, der er truffet bestemmelse om i artikel 21, skal enhver potentiel registrant af et indfasningsstof indsende alle følgende oplysninger til agenturet, i det format, der er fastlagt af agenturet i henhold til artikel 108:

   (a) stoffets navn og, hvis det er relevant, navnet på gruppen af stoffer, herunder Einecs-nummer og CAS-nummer, hvis sådanne foreligger

   (b) registrantens navn og adresse og angivelse af kontaktperson

   (c) den forventede frist for registrering/tonnage-gruppe

   (d) en angivelse af de fysisk-kemiske, toksikologiske og økotoksikologiske "endpoints"/egenskaber, for hvilke han eventuelt har relevante undersøgelser eller informationer til rådighed med henblik på opfyldelse af oplysningskravene i forbindelse med registrering

   (e) angivelse af hvorvidt undersøgelser henvist til i (d) omfatter forsøg med hvirveldyr, og hvis dette ikke er tilfældet, om han har til hensigt at afgive en positiv erklæring i overensstemmelse med artikel 9, litra a), nr. (x), sammen med registreringen.

   Den potentielle registrant kan begrænse de oplysninger, der skal indsendes i henhold til første afsnit, til de "endpoints"/egenskaber, for hvilke forsøg var påkrævet.

2. De oplysninger, der er omhandlet i stk. 1, skal indsendes senest 18 måneder inden:

(a) den i artikel 21, stk. 1, fastsatte frist for indfasningsstoffer fremstillet eller importeret i mængder på 1 000 tons eller mere pr. år

(b) den i artikel 21, stk. 2, fastsatte frist for indfasningsstoffer fremstillet eller importeret i mængder på 1 ton eller mere pr. år.

3. Registranter, der ikke indsender de oplysninger, der kræves i henhold til stk. 1, kan ikke påberåbe sig bestemmelserne i artikel 21.

4. Producenter og importører af indfasningsstoffer i mængder på mindre end 1 ton pr. år samt downstream-brugere kan indsende de oplysninger, der er omhandlet i stk. 1, til agenturet i det format, der er fastlagt af agenturet i henhold til artikel 108.

5. Agenturet registrerer de oplysninger, der fremsendes i henhold til stk. 1 til 4, i en database. Det giver de producenter og importører, der har indsendt oplysninger om det pågældende stof i henhold til stk. 1 til 4, adgang til data om de enkelte stoffer. De kompetente myndigheder i medlemsstaterne har også adgang til disse data.

Artikel 27
Forummer til udveksling af oplysninger om stoffer

1. Alle producenter og importører, der har indsendt oplysninger til agenturet i henhold til artikel 26 for samme indfasningsstof, deltager i et forum til udveksling af oplysninger om stoffer (SIEF - Substance Information Exchange Forum).

2. Formålet med hvert SIEF er gennem udveksling af oplysninger at reducere gentagelser af forsøg mest muligt. Deltagerne i et SIEF udleverer allerede eksisterende undersøgelser til andre deltagere, efterkommer anmodninger fra andre deltagere om oplysninger, identificerer kollektivt behovene for yderligere undersøgelser og tilrettelægger disses gennemførelse.

Artikel 28
Deling af data, hvori indgår forsøg med hvirveldyr

1. Før der udføres forsøg med hvirveldyr for at opfylde oplysningskravene i forbindelse med registrering, skal en deltager i et SIEF undersøge, om der foreligger en relevant undersøgelse ved at konsultere den database, der er omhandlet i artikel 26, og ved at kommunikere inden for det SIEF, som han deltager i. Hvis der findes en relevant undersøgelse inden for SIEF'et, anmoder en deltager i det SIEF, som vil skulle udføre et forsøg med hvirveldyr, inden to måneder efter den frist, der er fastsat i artikel 26, stk. 2, om at modtage denne undersøgelse .

Senest to uger efter fremsættelse af anmodningen forelægger undersøgelsens ejer dokumentation for undersøgelsens omkostninger over for den eller de deltagere, der anmoder om den. Deltageren/deltagerne og ejerne tager alle rimelige skridt for at opnå en aftale om indbyrdes deling af omkostningerne. Hvis de ikke kan nå frem til en sådan aftale, deles omkostningerne ligeligt. Ejeren udleverer undersøgelsen senest to uger efter modtagelse af betaling herfor.

2. Hvis der ikke foreligger en relevant undersøgelse med forsøg med hvirveldyr inden for SIEF'et, kontakter deltageren andre deltagere det SIEF, som har indsendt

oplysninger om samme eller lignende anvendelse af stoffet, og som måske skal udføre den pågældende undersøgelse. De træffer alle de nødvendige foranstaltninger for at opnå en aftale om, hvem der skal udføre undersøgelsen på vegne af de andre deltagere.

3. Hvis ejeren af en undersøgelse, som omhandlet i stk. 2, afviser enten at dokumentere omkostningerne i forbindelse med den pågældende undersøgelse eller at udlevere selve undersøgelsen til en anden eller andre deltagere, fortsætter den eller de andre deltagere som om der ikke forelå en relevant undersøgelse inden for SIEF'et, medmindre en anden registrering indsendt af en anden registrant omfatter resuméet eller det fyldige undersøgelsesresumé af undersøgelsen, afhængigt af det enkelte tilfælde. I sådanne tilfælde træffer agenturet afgørelse om at stille resuméet eller det fyldige undersøgelsesresumé, afhængigt af det enkelte tilfælde, til rådighed for den eller de andre deltagere. Den anden registrant har over for deltagerne krav på godtgørelse af en ligelig andel af omkostningerne, og dette krav skal have retskraft ved nationale domstole.

4. Agenturets afgørelser truffet i henhold til stk. 3 i denne artikel kan appelleres i overensstemmelse med bestemmelserne i artikel 87, 88 og 89.

5. Ejeren af undersøgelsen, som afviste enten at oplyse omkostningerne eller udlevere selve undersøgelsen, som omhandlet i stk. 3, straffes i henhold til artikel 123.

AFSNIT IV
OPLYSNINGER I FORSYNINGSKÆDEN

Artikel 29
Krav til sikkerhedsdatablade

1. Hvis et stof eller præparat opfylder kriterierne for klassificering som farligt i henhold til direktiv 67/548/EØF eller 1999/45/EF, skal den ansvarlige for markedsføringen af det pågældende stof eller præparat, uanset om den pågældende er producent, importør, downstream-bruger eller distributør, forsyne modtageren, som er en downstream-bruger eller distributør af stoffet, med et sikkerhedsdatablad udarbejdet i overensstemmelse med bilag Ia.

2. Enhver aktør i forsyningskæden, som skal udføre en kemisk sikkerhedsvurdering som led i hans registrering af et stof i henhold til artikel 13 eller 34, skal sikre, at oplysningerne i sikkerhedsdatabladet er i overensstemmelse med oplysningerne i en sådan sikkerhedsvurdering.

   Hvis sikkerhedsdatabladet udarbejdes for et præparat, kan aktøren i forsyningskæden udarbejde en kemisk sikkerhedsvurdering for præparatet i overensstemmelse med bilag Ib. I et sådant tilfælde er det tilstrækkeligt, at oplysningerne i sikkerhedsdatabladet er i overensstemmelse med den kemiske sikkerhedsrapport for præparatet i stedet for med den kemiske sikkerhedsrapport for hvert enkelt stof i præparatet.

3. Hvis et præparat ikke opfylder kriterierne for klassificering som farligt i henhold til artikel 5, 6 og 7 i direktiv 1999/45/EF, men i koncentrationer, der hver for sig er = 1 vægtprocent for ikke-gasformige præparater og = 0,2 volumenprocent for gasformige præparater, indeholder mindst ét stof med sundheds- eller miljøskadelige virkninger eller ét stof, for hvilket der i medfør af Fællesskabets bestemmelser er fastsat grænseværdier for eksponering på arbejdsstedet, skal den ansvarlige for markedsføringen af et præparat, uanset om det er producenten, importøren, en downstream-bruger eller leverandøren, på anmodning af en downstream-bruger forelægge et sikkerhedsdatablad udarbejdet i overensstemmelse med bilag Ia.

   Medmindre en downstream-bruger anmoder om det, er det ikke nødvendigt at levere et sikkerhedsdatablad, når de farlige stoffer eller præparater, som udbydes eller sælges til offentligheden, er forsynet med tilstrækkelige oplysninger til, at brugeren kan træffe de fornødne foranstaltninger med henblik på beskyttelse af sundhed, sikkerhed og miljø.

5. Sikkerhedsdatabladet skal, hvis en downstream-bruger anmoder herom, leveres på de officielle sprog i de medlemsstater, hvor stoffet eller præparatet markedsføres.

6. Sikkerhedsdatabladet skal være dateret og omfatte følgende punkter:

   1. identifikation af stoffet/præparatet og selskabet/virksomheden
   2. farlighedsidentifikation
   3. sammensætning/oplysning om indholdsstoffer
   4. førstehjælpsforanstaltninger
   5. brandbekæmpelse
   6. forholdsregler over for udslip ved uheld
   7. håndtering og opbevaring
   8. eksponeringskontrol/personlige værnemidler
   9. fysisk-kemiske egenskaber
   10. stabilitet og reaktivitet
   11. toksikologiske oplysninger
   12. miljøoplysninger
   13. forhold vedrørende bortskaffelse
   14. transportoplysninger
   15. oplysninger om regulering
   16. andre oplysninger.

Hvor der foretages en kemisk sikkerhedsvurdering, anføres de relevante eksponeringsscenarier i et bilag til sikkerhedsdatabladet.

7. For så vidt angår identificerede anvendelser anvender downstream-brugeren relevante oplysninger fra det sikkerhedsdatablad, som han har modtaget.

8. Et sikkerhedsdatablad leveres i papirform eller elektronisk senest på tidspunktet for den første leverance af et stof efter denne forordnings ikrafttrædelse. Leverandørerne ajourfører det straks i følgende tilfælde:

   (a) så snart nye data, som kan være nødvendige for at fastlægge og gennemføre passende risikostyringsforanstaltninger, foreligger

   (b) når stoffet er blevet registreret

   (c) når en godkendelse er blevet tildelt eller afvist

   (d) når der er blevet pålagt en begrænsning.

   Den nye, daterede version af oplysningerne, der mærkes "Revision (dato)", leveres gratis til alle tidligere modtagere, som de har leveret stoffet eller præparatet til inden for de forudgående 12 måneder.

Artikel 30

Forpligtelse til at videregive oplysninger nedad i forsyningskæden vedrørende stoffer og præparater, for hvilke der ikke kræves et sikkerhedsdatablad

1. Alle aktører i forsyningskæden for et stof alene eller i et præparat, som ikke skal levere et sikkerhedsdatablad i henhold til artikel 29, meddeler følgende oplysninger til den umiddelbart efterfølgende downstream-bruger eller distributør nedad i forsyningskæden:

   (a) det eller de i artikel 18, stk. 1, omhandlede registreringsnumre, hvis sådant eller sådanne foreligger

   (b) oplysning om, hvorvidt stoffet kræver godkendelse, og nærmere oplysninger om eventuel godkendelse tildelt eller afvist i denne forsyningskæde i henhold til afsnit VII

   (c) nærmere oplysninger om enhver begrænsning pålagt i henhold til afsnit VIII

   (d) alle andre foreliggende og relevante oplysninger om stoffet, som er nødvendige for at gøre det muligt at fastlægge og gennemføre passende foranstaltninger til risikostyring.

2. Oplysninger videregives skriftligt senest på tidspunktet for den første leverance af et stof efter denne forordnings ikrafttrædelse. Leverandørerne ajourfører disse oplysninger og videregiver dem straks nedad i forsyningskæden i følgende tilfælde:

   (a) så snart nye data, som kan være nødvendige for at fastlægge og gennemføre passende risikostyringsforanstaltninger, foreligger

(b) når stoffet er blevet registreret

(c) når en godkendelse er blevet tildelt eller afvist

(d) når der er blevet pålagt en begrænsning.

Disse nye oplysninger leveres gratis til alle tidligere modtagere, som de har leveret stoffet eller præparatet til inden for de forudgående 12 måneder.

Artikel 31

Forpligtelse til at videregive oplysninger om stoffer og præparater opad i forsyningskæden

Enhver aktør i forsyningskæden for et stof eller et præparat meddeler følgende oplysninger til den næste aktør eller distributør opad i forsyningskæden:

(a) nye oplysninger om farlige egenskaber, uanset hvilke anvendelser, der er tale om

(b) alle andre oplysninger, som kan sætte spørgsmålstegn ved tilstrækkeligheden af de foranstaltninger til risikostyring, der er identificeret i et sikkerhedsdatablad leveret til ham, idet disse oplysninger kun skal meddeles for identificerede anvendelser.

Distributører videregiver sådanne oplysninger til den efterfølgende aktør eller distributør opad i forsyningskæden.

Artikel 32

Arbejdstagernes adgang til oplysningerne i sikkerhedsdatablade

Arbejdstagere og deres repræsentanter skal af deres arbejdsgiver gives adgang til de oplysninger, der er leveret i henhold til artikel 29 og 30, vedrørende stoffer, som de anvender eller kan blive eksponeret for under udførelse af deres arbejde.

Artikel 33

Forpligtelse til at opbevare oplysninger

Alle aktører i forsyningskæden skal samle alle de oplysninger, som de har brug for for at opfylde deres forpligtelser i henhold til denne forordning, og holde dem tilgængelige i en periode på mindst 10 år efter det tidspunkt, hvor de sidst fremstillede, importerede, leverede eller anvendte stoffet alene eller i et præparat. Enhver aktør i forsyningskæden skal efter anmodning straks fremsende sådanne oplysninger til eller gøre dem tilgængelige for enhver kompetent myndighed i den medlemsstat, hvor den pågældende aktør i forsyningskæden er etableret, eller til agenturet, med forbehold af bestemmelserne i afsnit II og VI.

AFSNIT V
DOWNSTREAM-BRUGERE

Artikel 34

Downstream-brugernes kemiske sikkerhedsvurdering og pligt til at anvende og anbefale risikobegrænsende foranstaltninger

1. En downstream-bruger kan levere oplysninger for at hjælpe med udarbejdelsen af en registrering.

2. Enhver downstream-bruger har ret til skriftligt at underrette den producent, importør eller downstream-bruger, som leverer et stof til ham, om en anvendelse med det formål at gøre denne anvendelse til en identificeret anvendelse. Når han gør dette, skal han levere tilstrækkelige oplysninger til at sætte sin leverandør i stand til at udarbejde et eksponeringsscenario til anvendelse i leverandørens kemiske sikkerhedsvurdering.

3. For så vidt angår registrerede stoffer skal producenten eller importøren opfylde den i artikel 13 fastlagte forpligtelse, enten før han næste gang leverer stoffet til den downstream-bruger, der fremsætter anmodningen, hvis anmodningen blev fremsat mindst én måned før leveringen, eller inden for en måned efter anmodningen, afhængig af hvilket tidspunkt er det seneste. For så vidt angår indfasningsstoffer skal producenten eller importøren efterkomme en sådan anmodning og opfylde forpligtelserne fastsat i artikel 13 før udløbet af den relevante frist i artikel 21, under forudsætning af at downstream-brugeren fremsætter anmodningen mindst 12 måneder før udløbet af den pågældende frist.

4. En downstream-bruger af et stof alene eller i et præparat udarbejder en kemisk sikkerhedsrapport i overensstemmelse med bilag XI for så vidt angår enhver anvendelse, der falder uden for de betingelser, som er beskrevet i et eksponeringscenario, som han har modtaget i et sikkerhedsdatablad.

   Hvis en downstream-bruger gennemfører eller anbefaler et eksponeringsscenario, som mindst omfatter de betingelser, som han har fået beskrevet i det eksponeringsscenario, som han har modtaget, behøver han ikke udarbejde en kemisk sikkerhedsrapport.

   Downstream-brugeren behøver ikke at udarbejde en kemisk sikkerhedsrapport, hvis der er tale om et af følgende tilfælde:

   (a) det kræves ikke, at der følger et sikkerhedsdatablad med stoffet

   (b) det kræves ikke, at hans leverandør udarbejder en kemisk sikkerhedsrapport.

5. Enhver downstream-bruger identificerer, gennemfører og, hvis dette er relevant, anbefaler passende foranstaltninger til en tilfredsstillende styring af risici, som er identificeret i enten:

   (a) det eller de sikkerhedsdatablade, som han har modtaget, eller

   (b) i hans egen kemiske sikkerhedsvurdering.

6. Downstream-brugere skal gøre deres kemiske sikkerhedsrapport tilgængelig og holde den ajourført.

7. Artikel 13, stk. 2 og 5, finder tilsvarende anvendelse.

Artikel 35

Forpligtelse for downstream-brugere til at fremsende oplysninger

1. Før en downstream-bruger påbegynder en særlig anvendelse af et stof, der af en aktør længere opad i forsyningskæden er blevet registreret i overensstemmelse med artikel 5 eller 16, skal han meddele agenturet de oplysninger, der er angivet i denne artikels stk. 2, hvis han har modtaget et sikkerhedsdatablad, der omfatter et eksponeringscenario, og anvender stoffet uden for de betingelser, der er beskrevet i dette eksponeringsscenario.

2. De oplysninger, der indberettes af downstream-brugeren, skal omfatte følgende oplysninger i det format, der er fastlagt af agenturet i henhold til artikel 108:

   (a) hans identitet og oplysninger om, hvorledes han kan kontaktes

   (b) det eller de i artikel 18, stk. 1, omhandlede registreringsnumre, hvis sådant eller sådanne foreligger

   (c) stoffets/stoffernes identitet, som angivet i punkt 2 i bilag IV

   (d) producentens/producenternes eller importørens/importørernes identitet, hvis denne kendes

   (e) en kortfattet generel beskrivelse af anvendelsen/anvendelserne

   (f) et forslag til yderligere forsøg med hvirveldyr, hvis dette af downstream-brugeren anses for nødvendigt for at fuldstændiggøre hans kemiske sikkerhedsvurdering.

3. Downstream-brugeren ajourfører straks disse oplysninger, hvis der finder en ændring sted i de oplysninger, der er indberettet i overensstemmelse med stk. 1.

4. En downstream-bruger underretter agenturet i det format, der er fastlagt af agenturet i henhold til artikel 108, hvis hans klassificering af et stof afviger fra leverandørens klassificering.

5. Der kræves ikke indberetning i henhold til stk. 1 til 4 for et stof, alene eller i et præparat, der anvendes af en downstream-bruger i mængder på under 1 ton pr. år.

Artikel 36

Anvendelse af bestemmelserne om downstream-brugernes forpligtelser

1. Downstream-brugerne skal opfylde kravene i artikel 34 senest 12 måneder efter at have modtaget et registreringsnummer meddelt dem af deres leverandører i et sikkerhedsdatablad.

2. Downstream-brugerne skal opfylde kravene i artikel 35 senest 6 måneder efter at have modtaget et registreringsnummer meddelt dem af deres leverandører i et sikkerhedsdatablad.

AFSNIT VI
VURDERING AF STOFFER

KAPITEL 1
ANVENDELSESOMRÅDE

Artikel 37
Anvendelsesområde

Polymerer er undtaget fra vurdering i henhold til dette afsnit.

KAPITEL 2
DOSSIER-VURDERING

Artikel 38
Den kompetente myndighed

1. For så vidt angår artikel 39 til 43 er den kompetente myndighed den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor fremstillingen finder sted eller importøren er etableret.

2. Hvis flere producenter eller importører har dannet et konsortium i overensstemmelse med artikel 10 eller 17, er den kompetente myndighed den kompetente myndighed for den ene producent eller importør, der indsender data til agenturet på vegne af de andre i henhold til artikel 10 eller 17.

Artikel 39
Gennemgang af forslag til forsøg

1. Den kompetente myndighed behandler ethvert forslag til forsøg, som er skitseret i en registrering eller en indberetning fra en downstream-bruger, til frembringelse af de oplysninger, der er nærmere angivet i bilag VII og VIII, for et stof.

2. På grundlag af behandlingen i henhold til stk. 1 udarbejder den kompetente myndighed et udkast til en af følgende afgørelser og træffer denne afgørelse efter proceduren i artikel 48 og 49:

   (a) en afgørelse, der pålægger registranten/registranterne eller downstream-brugeren/downstream-brugerne at udføre det foreslåede forsøg og fastsætter en frist for indsendelse af et resumé af forsøgsresultaterne, eller det fyldige undersøgelsesresumé, hvis dette er påkrævet i henhold til bilag I

   (b) en afgørelse i overensstemmelse med litra (a), men med ændring af de betingelser, som forsøget skal udføres i henhold til

(c) en afgørelse, der afviser forslaget til forsøg.

3. Registranten indsender de krævede oplysninger til agenturet.

Artikel 40
Overensstemmelseskontrol af registreringer

1. Den kompetente myndighed kan gennemgå enhver registrering for at kontrollere et enkelt eller begge af de følgende forhold:

(a) at oplysningerne i det tekniske dossier/de tekniske dossierer, der er indsendt i henhold til artikel 9, er i overensstemmelse med kravene i artikel 9, 11 og 12 og med bilag IV til VIII

(b) at tilpasningerne af standardkravene for oplysninger og begrundelserne herfor, som indgivet i det tekniske dossier/de tekniske dossierer, er i overensstemmelse med reglerne for sådanne tilpasninger, som omhandlet i bilag V til VIII, og med de generelle regler omhandlet i bilag IX.

2. På grundlag af en gennemgang foretaget i henhold til stk. 1 kan den kompetente myndighed udarbejde et udkast til afgørelse, der pålægger registranten/registranterne at fremsende enhver form for oplysninger, der er påkrævede for at bringe registreringen/registreringerne i overensstemmelse med de relevante oplysningskrav, og en sådan afgørelse træffes i overensstemmelse med den i artikel 48 og 49 fastsatte procedure.

3. Registranten indsender de krævede oplysninger til agenturet.

Artikel 41
Kontrol af indsendte oplysninger og opfølgning af dossier-vurderingen

1. Den kompetente myndighed gennemgår alle oplysninger indsendt som følge af en afgørelse truffet i henhold til artikel 39 eller 40, og udarbejder om nødvendigt udkast til enhver passende afgørelse i overensstemmelse med artikel 39 eller 40.

2. Når dossier-vurderingen er afsluttet, anvender den kompetente myndighed oplysningerne fra denne vurdering i forbindelse med artikel 43a bis, stk. 1, artikel 56, stk. 3, og artikel 66, stk. 2, og fremsender de fremkomne oplysninger til Kommissionen, agenturet og de andre medlemsstater. Den kompetente myndighed underretter Kommissionen, agenturet, registranten og de kompetente myndigheder i de andre medlemsstater om dens konklusioner med hensyn til, hvorvidt og hvorledes de fremkomne oplysninger skal anvendes.

Artikel 42
Procedure og frister for behandling af forslag til forsøg

1. En kompetent myndighed, der påbegynder vurderingen af et forslag til forsøg i henhold til artikel 39, underretter agenturet herom.

2. Den kompetente myndighed udarbejder et udkast til afgørelse i overensstemmelse med artikel 39, stk. 2, inden for en frist på 120 dage fra modtagelsen fra agenturet af

en registrering eller en indberetning fra en downstream-bruger med et forslag til forsøg.

3. Hvis der er tale om indfasningsstoffer udarbejder den kompetente myndighed udkast til afgørelser i overensstemmelse med artikel 39, stk. 2:

(a) inden for en frist på 5 år efter denne forordnings ikrafttrædelse for alle registreringer, der modtages inden for den frist, der er omhandlet i artikel 21, stk. 1, og som indeholder forslag til forsøg med henblik på opfyldelse af oplysningskravene i bilag VII og VIII

(b) inden for en frist på 9 år efter denne forordnings ikrafttrædelse for alle registreringer, der modtages inden for den frist, der er omhandlet i artikel 21, stk. 2, og som indeholder forslag til forsøg med henblik på opfyldelse af oplysningskravene i bilag VII alene

(c) efter de i litra (a) og (b) fastsatte frister for alle registreringer, der indeholder forslag til forsøg modtaget inden for den frist, de er omhandlet i artikel 21, stk. 3.

4. Når den kompetente myndighed i en medlemsstat afslutter vurderinger af et indfasningsstof i henhold til artikel 39, underretter den agenturet herom.

Artikel 43
Procedure og frister for overensstemmelseskontrol

1. En kompetent myndighed, der påbegynder vurderingen af en registrering i henhold til artikel 40, underretter agenturet herom.

2. Den kompetente myndighed udarbejder et udkast til afgørelse i henhold til artikel 40, stk. 2, inden 12 måneder efter påbegyndelsen af vurderingen af stoffet.

3. Når den kompetente myndighed i en medlemsstat afslutter vurderingen af et indfasningsstof i henhold til artikel 40, underretter den agenturet herom.

KAPITEL 3
STOFVURDERING

Artikel 43a
Kriterier for stofvurdering

For at tilvejebringe en harmoniseret fremgangsmåde udarbejder agenturet kriterier for prioritering af stoffer med henblik på yderligere vurdering. Prioritering finder sted på grundlag af en risikobaseret fremgangsmåde. Kriterierne for vurdering omfatter data vedrørende farer, eksponeringsdata og tonnagegrupper. Agenturet træffer en afgørelse om kriterierne for prioritering af stoffer til yderligere vurdering. Medlemsstaterne anvender disse kriterier ved udarbejdelse af deres rullende planer.

Artikel 43a bis

Den kompetente myndighed

1. En medlemsstat optager et stof i en rullende plan med henblik på at blive den kompetente myndighed i henhold til artikel 44, 45 og 46, hvis den pågældende medlemsstat enten som et resultat af en dossier-vurdering foretaget af dens kompetente myndighed, som omhandlet i artikel 38, eller på grundlag af oplysninger fra enhver anden kilde, herunder oplysninger i registreringsdossieret, har grund til at nære mistanke om, at stoffet udgør en risiko for menneskers sundhed eller miljøet, navnlig på grundlag af et af følgende forhold:

   (a) stoffets strukturelle lighed med kendte problematiske stoffer eller med stoffer, der er persistente eller tilbøjelige til at være bioakkumulerende, tyder på at stoffet eller et eller flere af dets omdannelsesprodukter har problematiske egenskaber eller er persistente og tilbøjelige til at være bioakkumulerende

   (b) den samlede tonnage ud fra registreringer indsendt af flere registranter.

2. Den i stk. 1 nævnte rullende plan omfatter en periode på 3 år, den ajourføres hvert år, og den angiver de stoffer, som medlemsstaten planlægger at vurdere hvert enkelt år. Medlemsstaten fremsender den rullende plan til agenturet og de andre medlemsstater senest den 28. februar hvert år. Agenturet kan fremsætte kommentarer, og medlemsstaterne kan fremsende deres kommentarer til agenturet eller give udtryk for interesse for at vurdere et stof senest den 31. marts hvert år.

3. I tilfælde, hvor der ikke er fremsat kommentarer til en rullende plan, eller en anden medlemsstat ikke har udtrykt interesse, vedtager medlemsstaten den pågældende rullende plan. Den kompetente myndighed er den kompetente myndighed i den medlemsstat, som har optaget stoffet i dens endelige rullende plan.

4. I tilfælde, hvor to eller flere medlemsstater har optaget det samme stof i deres udkast til rullende planer, eller, efter indsendelse af de rullende planer, har udtrykt interesse for at vurdere det samme stof, bestemmes den kompetente myndighed med hensyn til artikel 44, 45 og 46 i henhold til den procedure, der er fastlagt i andet, tredje og fjerde afsnit.

   Agenturet forelægger sagen for det medlemsstatsudvalg, der er truffet bestemmelse om i artikel 72, stk. 1, litra e), herefter benævnt "medlemsstatsudvalget", for at nå til enighed om, hvilken myndighed, der skal være den kompetente myndighed, under hensyntagen til princippet om, at fordelingen af stoffer på medlemsstater skal afspejle deres andel af Fællesskabets samlede bruttonationalprodukt. Hvor det er muligt, gives der prioritet til medlemsstater, der allerede har foretaget dossier-vurderinger af det pågældende stof i henhold til artikel 39 til 43.

   Hvis medlemsstatsudvalget inden for en periode på 60 dage efter forelæggelsen når til enstemmig enighed, vedtager de berørte medlemsstater deres endelige rullende planer i overensstemmelse hermed. Den kompetente myndighed er den kompetente myndighed i den medlemsstat, som har optaget stoffet i dens endelige rullende plan.

   Hvis medlemsstatsudvalget ikke når til enstemmig enighed, fremsender agenturet de modstridende holdninger til Kommissionen, som afgør hvilken myndighed, der skal være den kompetente myndighed, i overensstemmelse med den procedure, der er

omhandlet i artikel 130, stk. 3, og medlemsstaterne vedtager deres endelige rullende planer i overensstemmelse hermed.

5. Så snart de kompetente myndigheder er fastlagt, offentliggør agenturet de endelige rullende planer på dets websted.

6. Den kompetente myndighed, der er fastlagt i overensstemmelse med stk. 1 til 4, vurderer alle stoffer i dens rullende plan i overensstemmelse med dette kapitel.

Artikel 44
Anmodninger om yderligere oplysninger

1. Hvis den kompetente myndighed anser yderligere oplysninger for påkrævede med henblik på at afklare den mistanke, der er omhandlet i artikel 43a bis, stk. 1, herunder, hvis dette er hensigtsmæssigt, oplysninger, der ikke kræves i henhold til bilag V til VIII, udarbejder den et begrundet udkast til en afgørelse, der kræver, at registranten eller registranterne indsender yderligere oplysninger. Afgørelsen træffes efter proceduren fastlagt i artikel 48 og 49.

2. Registranten indsender de krævede oplysninger til agenturet.

3. Et udkast med krav om yderligere oplysninger fra registranten eller registranterne skal udarbejdes inden for 12 måneder efter offentliggørelse af den rullende plan på agenturets websted.

4. Når den kompetente myndighed afslutter dens vurdering i henhold til stk. 1, 2 og 3, underretter den agenturet herom inden 12 måneder efter påbegyndelsen af vurderingen af stoffet. Hvis denne frist overskrides, anses vurderingen for at være afsluttet.

Artikel 45
Sammenhæng med andre aktiviteter

1. Den kompetente myndighed baserer sin vurdering af et stof på eventuelt tidligere vurderinger i henhold til dette afsnit. Ethvert udkast til afgørelse, der kræver yderligere oplysninger i henhold til artikel 44, kan kun begrundes med ændrede forhold eller erhvervet viden.

2. For at sikre en harmoniseret fremgangsmåde med hensyn til anmodninger om yderligere oplysninger, overvåger agenturet udkast til afgørelser efter artikel 44 og udvikler kriterier og prioriteter. Hvor det er hensigtsmæssigt, træffes der gennemførelsesforanstaltninger i overensstemmelse med den i artikel 130, stk. 3, omhandlede procedure.

Artikel 46
Kontrol af indsendte oplysninger og opfølgning af stofvurderingen

1. Den kompetente myndighed gennemgår alle oplysninger indsendt som følge af en afgørelse truffet i henhold til artikel 44 og udarbejder om nødvendigt udkast til enhver passende afgørelse i overensstemmelse med artikel 44.

2. Når stofvurderingen er afsluttet, anvender den kompetente myndighed oplysningerne fra denne vurdering i forbindelse med artikel 56, stk. 3, og 66, stk. 2, og fremsender de fremkomne oplysninger til Kommissionen, agenturet og de andre medlemsstater. Den kompetente myndighed underretter Kommissionen, agenturet, registranten og de kompetente myndigheder i de andre medlemsstater om dens konklusioner med hensyn til anvendelsen af de fremkomne oplysninger.

KAPITEL 4
VURDERING AF MELLEMPRODUKTER

Artikel 47
Yderligere oplysninger om på stedet isolerede mellemprodukter

For på stedet isolerede mellemprodukter finder hverken bestemmelserne om dossiervurdering eller stofvurdering anvendelse. Hvis det imidlertid kan påvises, at der som følge af anvendelsen af isolerede mellemprodukter på stedet opstår en risiko, der giver anledning til samme niveau af problematiske egenskaber som anvendelsen af stoffer, der skal optages i bilag XIII i henhold til artikel 54, kan den kompetente myndighed i den medlemsstat på hvis område "stedet" er beliggende:

(a) kræve at registranten indsender yderligere oplysninger med direkte relation til den påviste risiko. Dette krav skal ledsages af en skriftlig begrundelse

(b) undersøge enhver form for indsendte oplysninger og om nødvendigt træffe passende risikobegrænsende foranstaltninger for at gribe ind over for de risici, der er påvist i forbindelse med det pågældende sted.

Den procedure, der er fastsat i første afsnit, må kun iværksættes af den deri nævnte kompetente myndighed.

Kapitel 5
Fælles bestemmelser

Artikel 48
Registranternes rettigheder

1. Den kompetente myndighed fremsender ethvert udkast til afgørelse i henhold til artikel 39, 40 eller 44 til den eller de berørte registranter eller den eller de berørte downstream-brugere og informerer dem om, at de har ret til at fremsætte kommentarer inden for en frist på 30 dage efter modtagelsen. Den kompetente myndighed tager hensyn til alle modtagne kommentarer og kan ændre udkastet til afgørelse i overensstemmelse hermed.

2. Hvis en registrant er ophørt med at fremstille eller importere stoffet, underretter han den kompetente myndighed herom, og deraf følger, at hans registrering ikke længere er gyldig, og at der ikke kan kræves yderligere oplysninger om det pågældende stof, medmindre han indsender en ny registrering.

3. Registranten kan ophøre med at fremstille eller importere stoffet efter modtagelse af udkastet til afgørelse. I sådanne tilfælde, underretter han den kompetente myndighed

herom, og deraf følger, at hans registrering ikke længere er gyldig, og at der ikke kan kræves yderligere oplysninger om det pågældende stof, medmindre han indsender en ny registrering.

4. Uanset bestemmelserne i stk. 2 og 3 kan der kræves yderligere oplysninger i henhold til artikel 44 i hvert af eller begge følgende tilfælde:

(a) hvis den kompetente myndighed udarbejder et dossier i overensstemmelse med bilag XIV, hvori det konkluderes, at der er en potentiel risiko for mennesker og miljø på længere sigt, der begrunder behovet for yderligere oplysninger

(b) hvis eksponeringen for det stof, der er fremstillet eller importeret af registranten/registranterne, bidrager betydeligt til denne risiko.

Proceduren i artikel 66 til 70 finder tilsvarende anvendelse.

Artikel 49
Vedtagelse af afgørelser under vurdering

1. En medlemsstats kompetente myndighed fremsender et udkast til afgørelse, der er udarbejdet i henhold til artikel 39, 40 eller 44, til agenturet sammen med eventuelle kommentarer fra registranten eller downstream-brugeren, og den redegør for, hvorledes der er taget hensyn til sådanne kommentarer. Agenturet rundsender dette udkast til afgørelse sammen med kommentarerne til de andre medlemsstaters kompetente myndigheder.

2. Inden for en frist på 30 dage efter rundsendelsen kan de andre medlemsstaters kompetente myndigheder over for agenturet foreslå ændringer af udkastet, idet der fremsendes en kopi til den kompetente myndighed. Agenturet kan inden for samme frist foreslå ændringer til udkastet til afgørelse, idet der sendes en kopi til den kompetente myndighed.

3. Hvis agenturet ikke modtager noget forslag inden for en frist på 30 dage eller ikke selv fremsætter et forslag, træffer det afgørelsen i den version, der er blevet fremsendt i henhold til stk. 1.

4. Hvis agenturet modtager et forslag til ændring, kan det ændre udkastet til afgørelse. Agenturet forelægger et udkast til afgørelse, sammen med eventuelle foreslåede ændringer, for medlemsstatsudvalget inden 15 dage efter udløbet af den periode på 30 dage, der er omhandlet i stk. 2. Agenturet gør det samme, hvis det har fremsat et forslag til ændring i henhold til stk. 2.

5. Agenturet fremsender straks ethvert forslag til ændring til alle berørte registranter eller downstream-brugere og giver dem en frist på 30 dage til at fremsætte kommentarer. Medlemsstatsudvalget tager hensyn til eventuelle modtagne kommentarer.

6. Hvis medlemsstatsudvalget inden for en periode på 60 dage efter forelæggelsen når til enstemmig enighed om udkastet til afgørelse, træffer agenturet afgørelse i overensstemmelser hermed.

Hvis medlemsstatsudvalget ikke når til enstemmig enighed, vedtager det en udtalelse i overensstemmelse med artikel 81, stk. 8, inden for en periode på 60 dage efter forelæggelsen. Agenturet fremsender denne udtalelse til Kommissionen.

7. Inden 60 dage efter modtagelsen af udtalelsen udarbejder Kommissionen et udkast til en afgørelse, der skal træffes i overensstemmelse med den i artikel 130, stk. 2, nævnte procedure.

8. Agenturets afgørelser truffet i henhold til stk. 3 og 6 kan appelleres i henhold til bestemmelserne i artikel 87, 88 og 89.

Artikel 50

Omkostningsdeling ved forsøg hvori indgår hvirveldyr, uden aftale mellem registranterne

1. Hvis en registrant eller downstream-bruger udfører forsøg på vegne af andre, bidrager de alle ligeligt til omkostningerne til den pågældende undersøgelse.

2. I det tilfælde, der er omhandlet i stk. 1, leverer den registrant eller downstream-bruger, der udfører forsøget, alle de andre berørte parter en kopi af forsøget.

3. Den person, der udfører og indsender undersøgelsen, kan i den forbindelse gøre et krav gældende over for de andre. De andre har krav på en kopi at undersøgelsen. Enhver berørt person kan fremsætte et krav for at forhindre en anden person i at fremstille, importere eller markedsføre stoffet, hvis den anden person enten ikke betaler sin del af omkostningerne eller ikke stiller sikkerhed for det pågældende beløb eller ikke udleverer en kopi af den gennemførte undersøgelse. Alle krav skal kunne gøres gældende ved de nationale domstole. Enhver person kan vælge at forelægge sit krav om godtgørelse for en voldgiftsinstans og acceptere denne instans afgørelse.

Artikel 51

Medlemsstaternes forpligtelse til at rapportere til agenturet

Senest den 28. februar hvert år aflægger hver medlemsstat rapport til agenturet om resultaterne i det forudgående kalenderår med hensyn til opfyldelse af de forpligtelser, der påhviler de kompetente myndigheder i medlemsstaten med hensyn til behandling af forslag til forsøg. Agenturet offentliggør straks disse oplysninger på dets websted.

AFSNIT VII
GODKENDELSE

KAPITEL 1
GODKENDELSESKRAV

Artikel 52
Formålet med godkendelse

Formålet med dette afsnit er at sikre, at det indre marked fungerer efter hensigten, samtidig med at det sikres, at risici i forbindelse med meget problematiske stoffer styres ordentligt, eller at disse stoffer erstattes af egnede alternative stoffer eller teknologier.

Artikel 53
Generelle bestemmelser

1. En producent, importør eller downstream-bruger må ikke markedsføre et stof til en anvendelse eller anvende det selv, hvis det pågældende stof er optaget i bilag XIII, medmindre:

   (a) stoffets anvendelse/anvendelser alene, i et præparat eller inkorporeret i en artikel, som stoffet markedsføres til eller som han selv anvender stoffet til, er blevet godkendt i henhold til artikel 57 til 61 eller

   (b) stoffets anvendelse/anvendelser alene, i et præparat eller inkorporeret i en artikel, som stoffet markedsføres til eller som han selv anvender stoffet til, er blevet undtaget fra godkendelseskravene i bilag XIII i henhold til artikel 55, stk. 2 eller

   (c) den i artikel 55, stk. 1, litra c) (i), omhandlede dato ikke er indtrådt eller

   (d) den dato, der er omhandlet i artikel 55, stk. 1, litra c) (i), er indtrådt, og han indsendte en ansøgning 18 måneder forud for denne dato, men der endnu ikke er truffet en afgørelse vedrørende ansøgningen om godkendelse, eller (e) godkendelse til den pågældende anvendelse er blevet givet til hans umiddelbart efterfølgende downstream-bruger, i tilfælde hvor stoffet er markedsført.

2. En downstream-bruger kan anvende et stof, der opfylder kriterierne i stk. 1, hvis den pågældende anvendelse er i overensstemmelse med betingelserne i en godkendelse givet til en aktør opad i hans forsyningskæde til den pågældende anvendelse.

3. Stk. 1 og 2 gælder ikke for anvendelse af stoffer, som er affald, og som behandles i et affaldsbehandlingsanlæg i overensstemmelse med betingelserne i en tilladelse givet i henhold til Rådets direktiv 75/442/EØF[46] og/eller Rådets direktiv 91/689/EØF[47], jf. dog forordning (EF) nr. .../... {POP-stoffer}.

4. Stk. 1 og 2 finder ikke anvendelse på anvendelsen af stoffer til videnskabelig forskning og udvikling eller til produkt- og procesorienteret forskning og udvikling, hvis de anvendes i mængder på højst 1 ton pr. år.

5. Stk. 1 og 2 finder ikke anvendelse på følgende anvendelser af stoffer:

   (a) anvendelser i plantebeskyttelsesmidler, som falder ind under direktiv 91/414/EØF

   (b) anvendelser i biocidholdige produkter, som falder ind under direktiv 98/8/EF

   (c) anvendelser som human- og veterinærmedicinske lægemidler, som falder ind under forordning (EØF) nr. 2309/93 og direktiv 2001/82/EF og 2001/83/EF

   (d) anvendelser som tilsætningsstoffer i levnedsmidler, som falder ind under direktiv 89/107/EØF

   (e) anvendelser som tilsætningsstoffer til foderstoffer, som falder ind under direktiv 70/524/EØF

   (f) anvendelser som aromastoffer i levnedsmidler, som falder ind under afgørelse 1999/217/EF

   (g) anvendelser som et på stedet isoleret mellemprodukt eller som et transporteret isoleret mellemprodukt

   (h) anvendelse som motorbrændstof omfattet af Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/70/EF[48]

   (i) anvendelser som brændstof i mobile eller faste forbrændingsanlæg til mineralske olieprodukter og anvendelse som brændstoffer i lukkede systemer.

6. For stoffer, der kræver godkendelse udelukkende fordi de opfylder kriterierne i artikel 54, litra a), b) og c), eller fordi de er identificerede i overensstemmelse med artikel 54, litra f), udelukkende på grund af fare for menneskers sundhed, finder denne artikels stk. 1 og 2 ikke anvendelse på følgende anvendelser:

   (a) anvendelser i kosmetiske midler, som falder ind under direktiv 76/768/EØF

   (b) anvendelser i materialer bestemt til at komme i berøring med levnedsmidler, som falder ind under direktiv 89/109/EØF.

7. Stk. 1 og 2 gælder ikke for anvendelse af stoffer, når de er til stede i præparater:

---

46 EFT L 194 af 25.7.1975, s. 39.
47 EFT L 377 af 31.12.1991, s. 20.
48 EFT L 350 af 28.12.1998, s. 58.

(a) under en koncentrationsgrænse på 0,1% for så vidt angår stoffer omhandlet i artikel 54, litra d), e) og f)

(b) under de koncentrationsgrænser, der er fastsat i direktiv 1999/45/EF, som fører til klassificering af præparatet som et farligt præparat, for så vidt angår alle andre stoffer.

Artikel 54
Stoffer, der skal optages i bilag XIII

Følgende stoffer kan optages i bilag XIII i henhold til den procedure, der er fastlagt i artikel 55:

(a) stoffer der opfylder kriterierne for klassificering som kræftfremkaldende i kategori 1 eller 2 i henhold til direktiv 67/548/EØF

(b) stoffer der opfylder kriterierne for klassificering som mutagene i kategori 1 eller 2 i henhold til direktiv 67/548/EØF

(c) stoffer, der opfylder kriterierne for klassificering som reproduktionstoksiske i kategori 1 eller 2 i henhold til direktiv 67/548/EØF

(d) stoffer, der er persistente, bioakkumulerende og toksiske i henhold til kriterierne i bilag XII

(e) stoffer, der er meget persistente og meget bioakkumulerende i henhold til kriterierne i bilag XII

(f) stoffer, som f.eks. stoffer med hormonforstyrrende egenskaber eller stoffer med persistente, bioakkumulerende og toksiske eller meget persistente og meget bioakkumulerende egenskaber, som ikke opfylder kriterierne i litra (d) og (e), og som fra tilfælde til tilfælde og i overensstemmelse med den i artikel 56 fastlagte procedure identificeres som havende så alvorlige og uoprettelige virkninger på mennesker eller miljø, at det svarer til virkningerne af de andre stoffer, der er anført i litra (a) til (e).

Artikel 55
Optagelse af stoffer i bilag XIII

1. Når der træffes en afgørelse om at optage stoffer, som er omhandlet i artikel 54 i bilag XIII, træffes denne afgørelse i overensstemmelse med den procedure, der er omhandlet i artikel 130, stk. 3. I afgørelser herom specificeres for hvert stof:

(a) stoffets identitet

(b) stoffets iboende egenskab/egenskaber, som omhandlet i artikel 54

(c) overgangsordninger:

(i) den eller de datoer fra hvilke markedsføringen og anvendelsen af stoffet forbydes, medmindre der er udstedt en godkendelse, herefter benævnt "solnedgangsdatoen"

(ii) en eller flere datoer mindst 18 måneder før solnedgangsdatoen/-datoerne, inden hvilken ansøgninger skal være modtaget, hvis ansøgeren ønsker at fortsætte med at anvende stoffet eller markedsføre det til bestemte anvendelser efter solnedgangsdatoen/-datoerne. Disse fortsatte anvendelser tillades efter solnedgangsdatoen, indtil der er truffet en afgørelse vedrørende ansøgningen om godkendelse

(d) frister for revidering af bestemte anvendelser, hvis dette er relevant

(e) eventuelle anvendelser eller kategorier af anvendelser undtaget fra godkendelseskravet og eventuelle betingelser for sådanne undtagelser.

2. Anvendelser eller kategorier af anvendelser kan undtages fra godkendelseskravet. Ved fastsættelsen af sådanne undtagelser tages der navnlig hensyn til følgende:

(a) eksisterende specifik fællesskabslovgivning, der pålægger mindstekrav vedrørende beskyttelse af sundhed og/eller miljø i forbindelse med anvendelse af det pågældende stof, som f.eks. bindende grænseværdier for erhvervsmæssig eksponering, emissionsgrænser osv.

(b) allerede eksisterende juridiske forpligtelser til at træffe passende tekniske og ledelsesmæssige foranstaltninger for at sikre overholdelsen af relevante standarder for sundhed, sikkerhed og miljø i forbindelse med anvendelse af stoffet.

Undtagelser kan være underlagt visse betingelser.

3. Forud for en afgørelse om at optage stoffer i bilag XIII anbefaler agenturet prioritetsstoffer til optagelse, og for hvert stof specificeres de punkter, der er nævnt i stk. 1. Der gives normalt prioritet til stoffer med:

(a) PBT- eller vPvB-egenskaber

(b) udbredt og spredt anvendelse eller

(c) anvendelse i store mængder.

Antallet af stoffer optaget i bilag XIII og de datoer, der fastlægges i henhold til stk. 1, skal også tage hensyn til agenturets kapacitet til behandle ansøgninger inden for de fastlagte frister.

4. Før agenturet fremsender dets anbefaling til Kommissionen, gør det den offentlig tilgængelig på agenturets websted med tydelig angivelse af datoen for offentliggørelsen. Agenturet opfordrer alle berørte parter til at fremsende kommentarer inden 3 måder efter datoen for offentliggørelse, navnlig vedrørende følgende:

(a) opfyldelse af kriterierne i artikel 54, litra d), e) og f)

(b) anvendelser, som bør undtages fra kravet om godkendelse.

Agenturet ajourfører dets anbefaling under hensyntagen til de modtagede kommentarer.

5. Efter optagelse af et stof i bilag XIII vil dette stof ikke blive underlagt nye begrænsninger i henhold til den procedure, der er omhandlet i afsnit VIII, som vedrører risici for menneskers sundhed eller miljøet ved anvendelse af stoffet som følge af de iboende egenskaber, der er specificeret i bilag XIII.

6. Stoffer for hvilke alle anvendelser er blevet forbudt i henhold til afsnit VIII eller gennem anden fællesskabslovgivning optages ikke i bilag XIII, eller de fjernes fra dette bilag.

Artikel 56

Identificering af de stoffer, der er henvist til i artikel 54, litra d), e) og f)

1. For at identificere de stoffer, der er henvist til i artikel 54, litra d), e) og f), finder den i stk. 2 til 7 i denne artikel omhandlede procedure anvendelse forud for enhver anbefaling i henhold til artikel 55, stk. 3.

2. Kommissionen kan anmode agenturet om at udarbejde et dossier i overensstemmelse med bilag XIV for stoffer, som efter dens opfattelse opfylder de kriterier, der er omhandlet i artikel 54, litra d), e), og f). Agenturet rundsender dette dossier til medlemsstaterne.

3. Enhver medlemsstat kan udarbejde et dossier i overensstemmelse med bilag XIV for stoffer, som efter dens opfattelse opfylder de kriterier, der er omhandlet i artikel 54, litra d), e) og f), og fremsende dette til agenturet. Agenturet rundsender dette dossier til de andre medlemsstater.

4. Senest 30 dage efter rundsendelsen kan de andre medlemsstater eller agenturet kommentere identifikationen af stoffer i dossieret til agenturet.

5. Hvis agenturet ikke modtager kommentarer, kan det optage det pågældende stof i dets anbefalinger i henhold til artikel 55, stk. 3.

6. Agenturet forelægger efter modtagelse af kommentarer fra en medlemsstat eller på eget initiativ dossieret for medlemsstatsudvalget senest 15 dage efter udløbet af den periode på 30 dage, der er omhandlet i stk. 4.

7. Hvis medlemsstatsudvalget inden for en periode på 30 dage efter forelæggelsen når til enstemmig enighed om identifikationen, kan agenturet optage det pågældende stof i dets anbefalinger i henhold til artikel 55, stk. 3. Hvis medlemsstatsudvalget ikke når til enstemmig enighed, vedtager det en udtalelse inden for en periode på 30 dage efter forelæggelsen. Agenturet fremsender denne udtalelse til Kommissionen sammen med oplysninger om mindretalssynspunkter i udvalget.

KAPITEL 2
TILDELING AF GODKENDELSER

Artikel 57
Tildeling af godkendelser

1. Kommissionen er ansvarlig for at træffe afgørelser om ansøgninger om godkendelser i henhold til dette afsnit.

2. En godkendelse tildeles, hvis risikoen for menneskers sundhed eller miljøet ved anvendelsen af et stof som følge af de iboende egenskaber, der er specificeret i bilag XIII, styres på passende vis, i overensstemmelse med bilag I, punkt 6, og som dokumenteret i ansøgerens kemiske sikkerhedsrapport.

   Kommissionen lader ikke følgende komme i betragtning:

   (a) risici for menneskers sundhed og miljøet som følge af emissioner af stoffet fra et anlæg, som er godkendt i henhold til Rådets direktiv 96/61/EF[49]

   (b) risici for og via vandmiljøet som følge af udledning af stoffet fra en punktkilde underlagt kravet om forudgående regulering, som omhandlet i artikel 11, stk. 3, i Europa-Parlamentet og Rådets direktiv 2000/60/EF[50] og lovgivning vedtaget i henhold til artikel 16 i samme direktiv

   (c) risiciene for menneskers sundhed som følge af anvendelse af stoffet i medicinsk udstyr omfattet af Rådets direktiv 90/385/EØF[51], Rådets direktiv 93/42/EØF[52] eller Europa-Parlamentet og Rådets direktiv 98/79/EF[53].

3. Hvis der ikke kan udstedes en godkendelse i henhold til stk. 2, kan der udstedes en godkendelse, hvis det påvises, at de samfundsøkonomiske fordele opvejer risiciene for menneskers sundhed eller miljøet som følge af anvendelse af stoffet, og hvis der ikke findes passende alternative stoffer eller teknologier. Afgørelse herom træffes efter at der er taget hensyn til alle af følgende elementer:

   (a) de risici, som anvendelsen af stoffet indebærer

   (b) de samfundsøkonomiske fordele ved dets anvendelse og de samfunds-økonomiske konsekvenser af en afvisning af godkendelse, som påvist af ansøgeren eller andre berørte parter

   (c) analysen af alternativer fremsendt af ansøgeren i henhold til artikel 59, stk. 5, og eventuelle bidrag fra tredjeparter indsendt i henhold til artikel 61, stk. 2

---

49 EFT L 257 af 10.10.1996, s. 26.
50 EFT L 327 af 22.12.2000, s. 1.
51 EFT L 189 af 20.7.1990, s. 17.
52 EFT L 169 af 12.7.1993, s. 1.
53 EFT L 331 af 7.12.1998, s. 1.

(d) foreliggende oplysninger om eventuelle alternative stoffer eller teknologiers risici for sundhed eller miljø.

4. En anvendelse godkendes ikke, hvis dette vil betyde en lempelse af en begrænsning fastsat i bilag XVI.

5. Der udstedes kun en godkendelse, hvis ansøgning er udfærdiget i overensstemmelse med kravene i artikel 59.

6. Godkendelser kan være underlagt visse betingelser, herunder frister for fornyet vurdering og/eller overvågning. Godkendelser givet i overensstemmelse med stk. 3 underlægges normalt en tidsgrænse.

7. I godkendelsen angives:

(a) den eller de personer, til hvilke godkendelsen udstedes

(b) stoffets eller stoffernes identitet

(c) den eller de anvendelser, som godkendelsen udstedes for

(d) eventuelle betingelser, som godkendelsen er underlagt

(e) eventuelle frister for fornyet vurdering

(f) eventuel overvågningsordning.

8. Uanset eventuelle betingelser for en godkendelse sikrer indehaveren af godkendelsen, at eksponeringsniveauet reduceres så meget som teknisk muligt.

Artikel 58

Fornyet vurdering af godkendelser

1. Godkendelser udstedt i henhold til artikel 57, stk. 3, som er underlagt en tidsgrænse, anses for gyldige, indtil Kommissionen træffer afgørelse om en ny ansøgning, forudsat at indehaveren af godkendelsen indsender en ny ansøgning senest 18 måneder før tidsgrænsens udløb. I stedet for at genindsende alle elementer af den oprindelige ansøgning, kan ansøgeren blot indsende nummeret på den nuværende godkendelse, jf. dog andet, tredje og fjerde afsnit.

Hvis han ikke kan godtgøre, at risikoen styres tilfredsstillende, indsender han en ajourføring af den samfundsøkonomiske analyse, den analyse af alternativer og den substitutionsplan, der indgik i den oprindelige ansøgning.

Hvis han kan godtgøre, at risikoen styres tilfredsstillende, indsender han en ajourføring af den kemiske sikkerhedsrapport.

Hvis andre elementer i den oprindelige ansøgning er ændret, indsender han også en ajourføring af disse elementer.

2. Godkendelser kan på ethvert tidspunkt tages op til fornyet vurdering, hvis forholdene for den oprindelige godkendelse er ændret, således at dette påvirker menneskers

sundhed eller miljøet, eller hvis de samfundsøkonomiske konsekvenser har ændret sig.

I sådanne tilfælde fastsætter Kommissionen en rimelig frist, inden for hvilken indehaveren eller indehaverne af godkendelsen kan indsende yderligere oplysninger, der er nødvendige for den fornyede vurdering, og den angiver, hvornår den agter at træffe en afgørelse i henhold til artikel 61.

3. I afgørelsen i forbindelse med den fornyede vurdering kan Kommissionen ændre godkendelsen, idet den tager hensyn til proportionaliteten, eller trække godkendelsen tilbage fra tidspunktet for afgørelsen, hvis den ikke ville være blevet udstedt under de ændrede forhold.

I tilfælde, hvor der er en alvorlig og umiddelbar risiko for menneskers sundhed eller miljøet, kan Kommissionen under hensyntagen til proportionaliteten midlertidigt ophæve godkendelsen, indtil den fornyede vurdering er foretaget.

4. Hvis en miljøkvalitetsnorm omhandlet i direktiv 96/61/EF ikke er opfyldt, kan godkendelser udstedt for det pågældende stof tages op til fornyet overvejelse.

5. Hvis de miljømål, der er omhandlet i artikel 4, stk. 1, i direktiv 2000/60/EF ikke er opfyldt, kan godkendelser udstedt for anvendelse af det pågældende stof i det relevante vandløbsopland tages op til fornyet overvejelse.

6. Hvis en anvendelse af et stof efterfølgende forbydes i bilag XVII, trækker Kommissionen godkendelsen for den pågældende anvendelse tilbage.

Hvis en anvendelse af et stof efterfølgende underlægges visse betingelser i bilag XVII, ændrer Kommissionen godkendelsen i overensstemmelse hermed.

Artikel 59
Ansøgninger om godkendelse

1. En ansøgning om godkendelse indgives til agenturet.

2. Ansøgninger om godkendelse kan indgives af producenten/producenterne, importøren/importørerne og/eller downstream-brugeren/-brugerne af et stof. Ansøgninger kan indgives af en eller flere personer.

3. Ansøgninger kan indgives for et eller flere stoffer og for en eller flere anvendelser. Ansøgninger kan indgives for ansøgerens egen anvendelse/egne anvendelser og/eller for anvendelser, som han agter at markedsføre stoffet til.

4. En ansøgning om godkendelse skal omfatte følgende oplysninger:

(a) stoffets/stoffernes identitet, som omhandlet i punkt 2 i bilag IV

(b) ansøgerens navn og oplysninger om, hvorledes han kan kontaktes

(c) en anmodning om godkendelse med angivelse af hvilken eller hvilke anvendelser, der søges godkendelse til, og omfattende anvendelse af stoffet i præparater og/eller inkorporering af stoffet i artikler, hvis dette er relevant

(d) en kemisk sikkerhedsrapport i henhold til bilag I, der omfatter risiciene for menneskers sundhed og/eller miljøet ved af anvendelsen af stoffet som følge af de iboende egenskaber, der er nærmere angivet i bilag XIII, medmindre en sådan allerede er indsendt som en del af registreringen.

5. Ansøgningen kan omfatte:

(a) en samfundsøkonomisk analyse gennemført i overensstemmelses med bilag XV

(b) en analyse af alternativerne med redegørelse for deres risici og de tekniske og økonomiske gennemførelsesmuligheder, i relevante tilfælde med vedlæggelse af en substitutionsplan, herunder forskning og udvikling, og en køreplan for ansøgerens foreslåede tiltag.

6. Ansøgningen omfatter ingen af de følgende elementer:

(a) risiciene for menneskers sundhed og miljøet som følge af emissioner af stoffet fra et anlæg, som er godkendt i henhold til direktiv 96/61/EF

(b) risiciene for og via vandmiljøet som følge af udledning af stoffet fra en punktkilde underlagt kravet om forudgående regulering, som omhandlet i artikel 11, stk. 3, i direktiv 2000/60/EF og lovgivning vedtaget i henhold til artikel 16 i samme direktiv

(c) risiciene for menneskers sundhed som følge af anvendelse af stoffet i medicinsk udstyr omfattet af direktiv 90/385/EØF, 93/42/EØF eller 98/79/EF.

7. En ansøgning om godkendelse indsendes til agenturet sammen med det af agenturet fastsatte gebyr.

Artikel 60

Efterfølgende ansøgninger om godkendelse

1. Hvis der er indgivet en ansøgning for en anvendelse af et stof, kan en efterfølgende ansøger ved hjælp af en dataadgangstilladelse fra den tidligere ansøger henvise til de dele af den tidligere ansøgning, der er indsendt i overensstemmelse med artikel 59, stk. 4, litra d), og stk. 5.

2. Hvis der er udstedt godkendelse for en anvendelse af et stof, kan en efterfølgende ansøger ved hjælp af en dataadgangstilladelse fra godkendelsens indehaver, henvise til de dele af indehaverens ansøgning, der er indsendt i overensstemmelse med artikel 59, stk. 4, litra d), og stk. 5.

Artikel 61

Procedure for afgørelser om godkendelser

1. Agenturet bekræfter datoen for modtagelse af ansøgningen. Agenturets udvalg for risikovurdering og samfundsøkonomisk analyse fremlægger deres udkast til afgørelser inden 10 måneder efter modtagelse af ansøgningen.

2. Agenturet offentliggør på sit websted generel information om anvendelser, som der er modtaget ansøgninger om, idet der tages fortrolighedshensyn i overensstemmelse med artikel 116, sammen med en frist, inden for hvilken berørte tredjeparter kan indsende oplysninger om alternative stoffer eller teknologier.

3. Ved udarbejdelsen af udtalelser kontrollerer de i stk. 1 nævnte udvalg først, at ansøgningen omfatter alle de oplysninger, der er angivet i artikel 59, for så vidt angår det pågældende udvalgs kompetenceområde. Hvis det er nødvendigt, anmoder udvalget ansøgeren om yderligere oplysninger for at bringe ansøgningen i overensstemmelse med kravene i artikel 59. De to udvalg tager også hensyn til eventuelle oplysninger indsendt af tredjeparter.

4. Udkastet til udtalelse skal omfatte følgende elementer:

   (a) udvalget for risikovurdering: en vurdering af risiciene for sundhed og/eller miljø som følge af anvendelsen/anvendelserne af stoffet som beskrevet i ansøgningen

   (b) udvalget for samfundsøkonomisk analyse: en vurdering af de samfunds-økonomiske faktorer i forbindelse med anvendelsen/anvendelserne af stoffet som beskrevet i ansøgningen, når der udfærdiges en ansøgning i overensstemmelse med artikel 59, stk. 5.

5. Agenturet sender disse udkast til udtalelser til ansøgeren inden udløbet af den frist, der er fastsat i stk. 1. Inden 1 måned efter modtagelse af udkastet til udtalelse, kan ansøgeren indsende et skriftligt varsel om, at han ønsker at fremsætte kommentarer. Modtagelse af udkast til udtalelse anses for at have fundet sted 7 dage efter afsendelse fra agenturet.

   Hvis ansøgeren ikke ønsker at fremsætte kommentarer, fremsender agenturet disse udtalelser til Kommissionen, medlemsstaterne og ansøgeren inden 15 dage efter udløbet af den periode, i hvilken ansøgeren kan fremsætte kommentarer, eller inden 15 dage efter modtagelse af meddelelse fra ansøgeren om, at han ikke har til hensigt at fremsætte kommentarer.

   Hvis ansøgeren ønsker at fremsætte kommentarer, sender han en skriftlig argumentation til agenturet inden 2 måneder efter modtagelse af udkastet til udtalelse. Udvalgene behandler kommentarerne og vedtager deres endelige udtalelser inden 2 måneder efter modtagelse af de skriftlige argumenter, idet de, hvor det er relevant, tager hensyn til sådan argumentation. Inden for en frist på yderligere 15 dage fremsender agenturet udtalelserne, med den skriftlige argumentation vedlagt, til Kommissionen, medlemsstaterne og ansøgeren.

6. Agenturet gør de ikke-fortrolige dele af dets udtalelser samt eventuelle bilag hertil offentligt tilgængelige på dets websted i overensstemmelse med artikel 116.

7. I tilfælde, der er omfattet af artikel 60, stk. 1, behandler agenturet ansøgningerne samlet, hvis fristen for den første ansøgning ikke kan overholdes.

8. Kommissionen udarbejder et udkast til afgørelse om godkendelse inden for en frist på 3 måneder efter modtagelsen af agenturets udtalelser. Den endelige afgørelse om tildeling eller afvisning af godkendelse træffes efter proceduren i artikel 130, stk. 2.

9. Kortfattede oplysninger om Kommissionens afgørelser, herunder godkendelsesnummer, offentliggøres i *Den Europæiske Unions Tidende*, og gøres offentligt tilgængelige i en database, der oprettes og ajourføres af agenturet.

10. I tilfælde omfattet af artikel 60, stk. 2, afkortes fristen i denne artikels stk. 1, til 5 måneder.

KAPITEL 3
GODKENDELSER I FORSYNINGSKÆDEN

Artikel 62
Godekendelsesindehavernes forpligtelser

Indehavere af en godkendelse anfører godkendelsesnummeret på etiketten, før de markedsfører stoffet til en godkendt anvendelse.

Artikel 63
Downstream-brugere

1. Downstream-brugere, der anvender et stof i overensstemmelse med artikel 53, stk. 2, underretter agenturet herom inden 3 måneder efter modtagelsen af den første leverance af stoffet. De anvender det af agenturet i henhold til det i artikel 108 fastlagte format.

2. Agenturet opretter og ajourfører en fortegnelse over downstream-brugere, der har underrettet agenturet i overensstemmelse med stk. 1. Agenturet giver de kompetente myndigheder i medlemsstaterne adgang til denne fortegnelse.

AFSNIT VIII
BEGRÆNSNINGER FOR FREMSTILLING, MARKEDSFØRING OG ANVENDELSE AF VISSE FARLIGE STOFFER OG PRÆPARATER

KAPITEL 1
GENERELLE SPØRGSMÅL

Artikel 64
Generelle bestemmelser

1. Et stof alene, i et præparat eller i en artikel, for hvilket der i bilag XVI indgår en begrænsning, må ikke fremstilles, markedsføres eller anvendes, medmindre det opfylder betingelserne i den pågældende begrænsning. Denne bestemmelse finder ikke anvendelse på fremstilling, markedsføring eller anvendelse af et stof til videnskabelig forskning og udvikling eller produkt- og procesorienteret forskning og udvikling, hvis det anvendes i mængder på højst 1 ton pr. år.

2. Et stof alene, i et præparat eller i en artikel, for hvilket der i bilag XVII indgår en begrænsning, må ikke fremstilles, markedsføres eller anvendes, medmindre det opfylder betingelserne i den pågældende begrænsning. Denne bestemmelser finder ikke anvendelse på fremstilling, markedsføring eller anvendelse af et stof til forskning på laboratorieniveau eller som referencestandard.

3. Stk. 1 og 2 gælder ikke for anvendelse af stoffer, som er affald, og som behandles i et affaldsbehandlingsanlæg i overensstemmelse med betingelserne i en tilladelse givet i henhold til direktiv 75/442/EØF og/eller direktiv 91/689/EØF, jf. dog forordning (EF) nr. .../... {POP-stoffer}.

KAPITEL 2
BEGRÆNSNINGSPROCESSEN

Artikel 65
Indførelse af nye og ændring af gældende begrænsninger

1. Når der er en uacceptabel risiko for menneskers sundhed eller miljøet som følge af fremstilling, anvendelse eller markedsføring af stoffer, som det er nødvendigt at gribe ind over for på fællesskabsplan, ændres bilag XVI efter den procedure, der er omhandlet i artikel 130, stk. 3, ved vedtagelse af nye begrænsninger, eller ved at ændre gældende begrænsninger i bilag XVI for fremstilling, anvendelse eller markedsføring af stoffer alene, i præparater eller i artikler i henhold til den procedure, der er omhandlet i artikel 66 til 70.

   Første afsnit finder ikke anvendelse på et stof som anvendes som et på stedet isoleret mellemprodukt, bortset fra de tilfælde, der er omfattet af stk. 3.

2. For stoffer, som opfylder kriterierne for klassificering som kræftfremkaldende, mutagene eller reproduktionstoksiske i kategori 1 og 2, og for hvilke Kommissionen foreslår begrænsninger for forbrugeranvendelse, ændres bilag XVI i henhold til den procedure, der er omhandlet i artikel 130, stk. 3. Artikel 66 til 70 finder ikke anvendelse.

3. Uanset bestemmelserne i artikel 55, stk. 5, forelægger Kommissionen, senest når et stof optages i Stockholm-konventionen eller UNECE-protokollen om POP-stoffer (persistente organiske miljøgifte), et udkast om optagelse af det pågældende stof i bilag XVII. Bestemmelserne i udkastet skal som et minimum gennemføre de forpligtelser, som Fællesskabet har i følge disse internationale forpligtelser. Bilag XVII ændres i overensstemmelse med proceduren i artikel 130, stk. 3. Artikel 66 til 70 finder ikke anvendelse.

4. Begrænsninger, der kun vedrører risici for menneskers sundhed ved brug af et stof i kosmetiske midler, som falder ind under direktiv 76/768/EØF, optages ikke i bilag XVI eller XVII.

Artikel 66
Udarbejdelse af et forslag

1. Hvis Kommissionen mener, at fremstillingen, markedsføringen eller anvendelsen af et stof alene, i et præparat eller i en artikel udgør en risiko for menneskers sundhed eller miljøet, som ikke i tilstrækkelig grad er styret, og som det er nødvendigt at gribe ind over for på fællesskabsplan, anmoder den agenturet om at udarbejde et dossier, som er i overensstemmelse med kravene i bilag XIV. Hvis det af dette dossier fremgår, at det er nødvendigt med en aktion på fællesskabsplan, ud over allerede eksisterende foranstaltninger, foreslår agenturet begrænsninger for at igangsætte begrænsningssprocessen.

   Agenturet henviser til ethvert medlemsstats-dossier, enhver kemisk sikkerhedsrapport eller risikovurdering indsendt til det i henhold til denne forordning. Det henviser også til enhver relevant risikovurdering indsendt af en tredjepart i forbindelse med andre fællesskabsforordninger eller -direktiver. Med henblik herpå videregiver andre organer, som f.eks. agenturer, der er oprettet af Fællesskabet og udøver tilsvarende opgaver, på anmodning oplysninger til agenturet.

2. Hvis en medlemsstat mener, at fremstillingen, markedsføringen eller anvendelsen af et stof alene, i et præparat eller i en artikel udgør en risiko for menneskers sundhed eller miljøet, som ikke i tilstrækkelig grad er styret, og som det er nødvendigt at gribe ind over for på fællesskabsplan, udarbejder den et dossier, som er i overensstemmelse med kravene i bilag XIV. Hvis det af dette dossier fremgår, at det er nødvendigt med en aktion på fællesskabsplan, ud over allerede eksisterende foranstaltninger, fremsender medlemsstaten det til agenturet i det format, der er omhandlet i bilag XIV, for at igangsætte begrænsningsprocessen.

   Medlemsstaterne henviser til ethvert dossier, enhver kemisk sikkerhedsrapport eller risikovurdering indsendt til agenturet i henhold til denne forordning. Medlemsstaterne henviser også til enhver relevant risikovurdering indsendt i forbindelse med andre fællesskabsforordninger eller -direktiver. Med henblik herpå videregiver andre organer, som f.eks. agenturer, der er oprettet af Fællesskabet og udøver tilsvarende opgaver, på anmodning oplysninger til den pågældende medlemsstat.

   Udvalget for risikovurdering og udvalget for samfundsøkonomisk analyse kontrollerer, at det indsendte dossier er i overensstemmelse med kravene i bilag XIV. Agenturet informerer inden for en frist på 30 dage efter modtagelsen den medlemsstat, der foreslår begrænsninger, om udvalget finder, at dossieret er i overensstemmelse med kravene. Hvis det ikke er det, angives grundene herfor skriftligt til medlemsstaten inden for en frist på 45 dage fra modtagelsen. Medlemsstaten bringer dossieret i overensstemmelse med kravene inden 30 dage efter modtagelse af grundene fra agenturet, og hvis ikke dette sker, anses proceduren i dette afsnit for afsluttet.

3. Agenturet giver straks på sit websted offentlig adgang til alle dossierer, der er i overensstemmelse med bilag XIV, herunder til foreslåede begrænsninger i henhold til stk. 1 og 2, idet offentliggørelsesdatoen klart angives. Agenturet opfordrer alle berørte parter til inden 3 måder efter datoen for offentliggørelse individuelt eller samlet at fremsende:

(a) kommentarer til dossierer og de foreslåede begrænsninger

(b) en samfundsøkonomisk analyse, eller oplysninger, der kan bidrage til en sådan, af de foreslåede begrænsninger, i hvilken fordele og ulemper ved de foreslåede begrænsninger behandles. Den skal være i overensstemmelse med kravene i bilag XV.

Artikel 67

Agenturets udtalelse: udvalget for risikovurdering

Inden 9 måneder efter den offentliggørelsesdato, der er omhandlet i artikel 66, stk.3, udarbejder udvalget for risikovurdering en udtalelse om de foreslåede begrænsninger på grundlag af dets gennemgang af de relevante dele af dossieret. I denne udtalelse tages hensyn til medlemstats-dossieret og til de berørte parters synspunkter, som omhandlet i artikel 66, stk. 3, litra a).

Artikel 68

Agenturets udtalelse: udvalget for samfundsøkonomisk analyse

1. Inden 12 måneder efter den offentliggørelsesdato, der er omhandlet i artikel 66, stk. 3, udarbejder udvalget for samfundsøkonomisk analyse en udtalelse om de foreslåede begrænsninger på grundlag af dets gennemgang af de relevante dele af dossieret og de samfundsøkonomiske konsekvenser. Det udarbejder et udkast til udtalelse om de foreslåede begrænsninger og de relaterede samfundsøkonomiske konsekvenser, idet det tager hensyn til eventuelle analyser eller oplysninger i henhold til artikel 66, stk. 3, litra b). Agenturet offentliggør straks udkastet til udtalelse på dets websted. Agenturet opfordrer de berørte parter til at fremsætte kommentarer til udkastet til udtalelse inden for en frist, der fastsættes af agenturet.

2. Udvalget for samfundsøkonomisk analyse vedtager straks dets udtalelse, idet det tager hensyn til yderligere relevante kommentarer modtaget inden for den fastsatte frist. I udtalelsen tages hensyn til de berørte parters kommentarer og samfundsøkonomiske analyser, som er indsendt i henhold til artikel 66, stk. 3, litra b), og artikel 68, stk. 1.

3. Hvis udtalelsen fra udvalget for risikovurdering afviger væsentligt fra de begrænsninger, der er foreslået af en medlemsstat eller Kommissionen, kan agenturet forlænge fristen for udtalelsen fra udvalget for samfundsøkonomisk analyse med indtil 90 dage.

Artikel 69

Fremsendelse af en udtalelse til Kommissionen

1. Agenturet fremsender Kommissionen udtalelserne fra udvalgene for risikovurdering og samfundsøkonomisk analyse om de foreslåede begrænsninger for stoffer alene, i præparater eller i artikler. Hvis et eller begge udvalg ikke fremsætter en udtalelse inden for den i artikel 67, stk. 1, og artikel 68, stk. 1, fastsatte frist, underretter agenturet Kommissionen herom og angiver grundende herfor.

2. Agenturet offentliggør straks de to udvalgs udtalelser på dets websted.

3. På anmodning udleverer agenturet alle dokumenter og dokumentation, som det har fået tilsendt, eller som det har gennemgået, til Kommissionen.

Artikel 70
Kommissionens afgørelse

1. Hvis de i artikel 65 fastsatte betingelser er opfyldt, udarbejder Kommissionen et udkast til ændring af bilag XVI inden 3 måneder efter modtagelse af udtalelsen fra udvalget for samfundsøkonomisk analyse eller inden udløbet af den frist, der er fastsat i henhold til artikel 68, hvis dette udvalg ikke fremsætter en udtalelse, alt efter hvilket tidspunkt der indtræder først.

   Hvis udkastet til ændring ikke er i overensstemmelse med nogen af agenturets udtalelser, vedføjer Kommissionen som bilag en detaljeret redegørelse for grundene til forskellene.

2. Den endelige afgørelse træffes efter proceduren i artikel 130, stk. 3.

AFSNIT IX
AGENTURET

Artikel 71
Oprettelse

Der oprettes et Europæisk Kemikalieagentur.

Artikel 72
Sammensætning

1. Agenturet består af:

   (a) en bestyrelse, som udfører de opgaver, der er fastsat i artikel 74

   (b) en administrerende direktør, som udfører de opgaver, der er fastsat i artikel 79

   (c) et udvalg for risikovurdering, som er ansvarlig for at udarbejde agenturets udtalelser om ansøgninger om godkendelser, forslag til begrænsninger og ethvert andet spørgsmål i forbindelse med denne forordning, der vedrører risici for menneskers sundhed eller miljøet

   (d) et udvalg for samfundsøkonomisk analyse, som er ansvarlig for at udarbejde agenturets udtalelser om ansøgninger om godkendelser, forslag til begrænsninger og ethvert andet spørgsmål i forbindelse med denne forordning, herunder samfundsøkonomisk analyse af konsekvenserne af eventuelle lovgivningsinitiativer vedrørende stoffer

   (e) et medlemsstatsudvalg, som er ansvarligt for at løse meningsforskelle med hensyn til udkast til afgørelser foreslået af medlemsstaterne i henhold til afsnit VI, og for at udarbejde agenturets udtalelse om forslag til klassificering og

etikettering i henhold til afsnit X samt forslag til identificering af meget problematiske stoffer, der skal underlægges godkendelsesproceduren i afsnit VII

(f) et forum til udveksling af information om håndhævelsesaktiviteter (herefter benævnt "forummet")

(g) et sekretariat, som yder udvalgene og forummet teknisk, videnskabelig og administrativ bistand og sørger for passende samordning af deres arbejde. Det varetager desuden det arbejde, som påhviler agenturet i forbindelse med procedurerne for præregistrering, registrering og gensidig anerkendelse af vurderinger, foruden at det udarbejder vejledninger og foretager databasevedligeholdelse og informationssøgning

(h) et appeludvalg, der træffer afgørelser om eventuelle indsigelser mod afgørelser truffet af agenturet.

2. De udvalg, der er omhandlet i stk. 1, litra c), d) og e), (herefter benævnt "udvalgene") og forummet kan nedsætte arbejdsgrupper. I forbindelse med deres forretningsordner vedtager de i det øjemed nærmere bestemmelser for uddelegering af visse opgaver til disse arbejdsgrupper.

3. Udvalgene og forummet kan, hvis de anser det for hensigtsmæssigt, søge rådgivning fra passende ekspertisekilder om vigtige spørgsmål af generel videnskabelig eller etisk art.

Artikel 73
Opgaver

1. Agenturet yder medlemsstaterne og Fællesskabets institutioner den bedst mulige videnskabelige og tekniske rådgivning i spørgsmål vedrørende kemikalier, som falder ind under dets referenceområde, og som der henvises til i overensstemmelse med bestemmelserne i denne forordning.

2. Sekretariatet udfører følgende opgaver:

(a) udførelse af de opgaver, det er tildelt i henhold til afsnit II; herunder fremme af en effektiv registrering af importerede stoffer på en måde, som er i overensstemmelse med Fællesskabets internationale handelsforpligtelser over for tredjelande

(b) udførelse af de opgaver, det er tildelt i henhold til afsnit III

(c) udførelse af de opgaver, det er tildelt i henhold til afsnit VI

(d) oprettelse og vedligeholdelse af database/databaser med oplysninger om alle registrerede stoffer, fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer og den harmoniserede klassificerings- og etiketteringsfortegnelse, offentliggørelse af alle de ikke-fortrolige oplysninger, som er angivet i artikel 116, stk. 1, i databasen/databaserne via Internet, og tilrådighedstillelse af andre ikke-fortrolige oplysninger i databaserne på anmodning

(e) offentliggørelse af oplysninger om, hvilke stoffer der er under vurdering eller er blevet vurderet inden 90 dage efter agenturets modtagelse af oplysningerne i overensstemmelse med artikel 116, stk. 1,

(f) tilrådighedstillelse af teknisk og videnskabelig vejledning og værktøjer, hvor dette er hensigtsmæssigt for opgaverne i henhold til denne forordning, navnlig for at hjælpe med industriens, især de små og mellemstore virksomheders (SVM'ers), udarbejdelse af kemiske sikkerhedsrapporter

(g) tilrådighedsstillelse af teknisk og videnskabelig vejledning om opgaverne i henhold til denne forordning for de kompetente myndigheder i medlemsstaterne og assistance til de helpdeske, der oprettes i henhold til afsnit XII

(h) udarbejdelse af forklarende information om denne forordning for andre involverede parter

(i) på Kommissionens anmodning levering af teknisk og videnskabelig støtte for tiltag til forbedring af samarbejdet mellem Fællesskabet, dets medlemsstater, internationale organisationer og tredjelande med hensyn til videnskabelige og tekniske spørgsmål vedrørende stoffers sikkerhed, samt aktiv deltagelse i teknisk bistand og kapacitetsopbyggende aktiviteter vedrørende forsvarlig forvaltning af kemikalier i udviklingslandene.

3. Udvalgene udfører følgende opgaver:

(a) de opgaver, de er tildelt i henhold til afsnit VI

(b) de opgaver, de er tildelt i henhold til afsnit VII

(c) de opgaver, de er tildelt i henhold til afsnit VIII

(d) de opgaver, de er tildelt i henhold til afsnit X

(e) på Kommissionens anmodning levering af teknisk og videnskabelig støtte for tiltag til forbedring af samarbejdet mellem Fællesskabet, dets medlemsstater, internationale organisationer og tredjelande med hensyn til videnskabelige og tekniske spørgsmål vedrørende stoffers sikkerhed, samt aktiv deltagelse i teknisk bistand og kapacitetsopbyggende aktiviteter vedrørende forsvarlig forvaltning af kemikalier i udviklingslandene

(f) på Kommissionens anmodning udarbejdelse af en udtalelse om alle andre aspekter vedrørende stoffer alene, i præparater eller artikler.

4. Forummet udfører følgende opgaver:

(a) udbredelse af god praksis og fremhævelse af problemer på fællesskabsplan

(b) fremsættelse af forslag om, koordinering og evaluering af harmoniserede håndhævelsesprojekter og fælles inspektioner

(c) koordinering af udvekslingen af inspektører

(d) identificering af håndhævelsesstrategier og minimumskriterier for håndhævelse

(e) udvikling af arbejdsmetoder og værktøjer til brug for lokale inspektører

(f) udvikling af en elektronisk procedure til udveksling af oplysninger

(g) kontakt til industrien og andre involverede parter, herunder relevante internationale organisationer, i nødvendigt omfang.

Artikel 74
Bestyrelsens beføjelser

Bestyrelsen udpeger den administrerende direktør i henhold til artikel 80 samt en regnskabsfører som omhandlet i artikel 43 i Kommissionens forordning (EF, Euratom) nr. 2343/2002.

Den vedtager:

(a) senest den 30. april hvert år agenturets almindelige beretning for det forudgående år og fremsender denne senest den 15. juni til medlemsstaterne, Europa-Parlamentet, Rådet, Kommissionen, Det Europæiske Økonomiske og Sociale Udvalg samt Revisionsretten

(b) senest den 31. oktober hvert år agenturets arbejdsprogram for det kommende år og fremsender dette til medlemsstaterne, Europa-Parlamentet, Rådet og Kommissionen

(c) agenturets endelige budget inden regnskabsårets begyndelse, idet den om nødvendigt justerer det i overensstemmelse med Fællesskabets tilskud og agenturets øvrige indtægter

(d) strukturen for agenturets gebyrer.

Den udarbejder og vedtager agenturets forretningsorden.

Den udfører sine opgaver i forbindelse med agenturets budget i overensstemmelse med artikel 93, 94 og 101.

Den har disciplinærmyndighed over den administrerende direktør.

Den fastsætter selv sin forretningsorden.

Den udpeger appeludvalgets formand samt medlemmer og suppleanter.

Hvert år fremsender det budgetmyndigheden alle oplysninger med relevans for resultatet af vurderingsproceduren.

Artikel 75
Bestyrelsens sammensætning

1. Bestyrelsen består af 6 repræsentanter for medlemsstaterne, der udpeges af Rådet, og 6 repræsentanter, der udpeges af Kommissionen, samt 3 enkeltpersoner uden stemmeret fra de berørte parter, der udpeges af Kommissionen.

2. Medlemmerne udpeges på grundlag af deres relevante erfaring og ekspertise inden for kemikaliesikkerhed eller kemikalielovgivning.

3. Mandatperioden er fire år. Den kan fornyes én gang. For det første mandat udpeger Rådet og Kommissionen dog tre af deres kandidater, for hvilke mandatperioden skal være 6 år.

Artikel 76
Bestyrelsens formandskab

1. Bestyrelsen vælger blandt sine medlemmer en formand og en næstformand. Næstformanden afløser automatisk formanden, når denne er forhindret i at udføre sit hverv.

2. Formandens og næstformandens mandatperiode er to år og udløber, når deres medlemskab af bestyrelsen ophører. Denne mandatperiode kan fornyes én gang.

Artikel 77
Møder

1. Bestyrelsen indkaldes til møde af formanden.

2. Den administrerende direktør deltager i bestyrelsens møder uden stemmeret.

3. Bestyrelsen kan invitere formændene for udvalgene eller formanden for forummet, som omhandlet i artikel 72, stk. 1, litra c) til f), til at deltage i møderne uden stemmeret.

Artikel 78
Afstemning

Bestyrelsen fastsætter afstemningsregler, herunder betingelser for, hvornår et medlem kan stemme på vegne af et andet medlem. Bestyrelsen træffer afgørelse med to tredjedeles flertal blandt alle de stemmeberettigede medlemmer.

Artikel 79
Den administrerende direktørs opgaver og beføjelser

1. Agenturet ledes af den administrerende direktør, som udfører sine opgaver i Fællesskabets interesse, uafhængigt af bestemte involverede parters særinteresser.

2. Den administrerende direktør er agenturets retlige repræsentant. Han er ansvarlig for:

   (a) den daglige ledelse af agenturet

   (b) administration af agenturets nødvendige ressourcer til udførelse af dets opgaver

   (c) overholdelse af de i fællesskabsretten fastsatte tidsfrister for agenturets afgivelse af udtalelser

(d) sikring af passende og rettidig koordinering mellem udvalgene og forummet

(e) indgåelse og forvaltning af de nødvendige kontrakter med tjenesteydere

(f) udarbejdelse af indtægts- og udgiftsoversigten og gennemførelse af agenturets budget

(g) alle personalespørgsmål

(h) tilvejebringelse af en sekretariatsfunktion for bestyrelsen

(i) udarbejdelse af udkast til bestyrelsens udtalelser om forslag til udvalgenes og forummets forretningsordener

(j) tilrettelæggelse af udførelsen af alle andre funktioner, som Kommissionen måtte uddelegere til agenturet.

3. Hvert år forelægger den administrerende direktør bestyrelsen følgende til godkendelse:

(a) et udkast til beretning om agenturets aktiviteter det forudgående år, herunder oplysninger om antallet af modtagne registreringsdossierer, antal vurderede stoffer, antal modtagne ansøgninger om godkendelse, antal forslag til begrænsninger modtaget af agenturet, som det har afgivet udtalelse om, tid medgået til gennemførelse af de dermed forbundne procedurer, og de godkendte stoffer, afviste dossierer, stoffer for hvilke der er indført begrænsninger; modtagede klager og behandling af disse; en oversigt over forummets aktiviteter

(b) et udkast til arbejdsprogram for det kommende år

(c) et udkast til årsregnskab

(d) et forslag til budget for det kommende år.

Artikel 80
Udnævnelse af den administrerende direktør.

1. Kommissionen foreslår kandidater til stillingen som administrerende direktør på grundlag af en liste efter opslag af stillingen i *Den Europæiske Unions Tidende* og andre hensigtsmæssige steder i pressen eller på websteder.

2. Agenturets administrerende direktør udpeges af bestyrelsen på grundlag af merit og dokumenterede administrative og ledelsesmæssige egenskaber samt relevant erfaring inden for kemikaliesikkerhed og kemikalielovgivning. Bestyrelsen træffer afgørelse med to tredjedeles flertal blandt alle de stemmeberettigede medlemmer.

Bestyrelsen har beføjelse til at afskedige den administrerende direktør i henhold til samme procedure.

3. Den administrerende direktørs mandatperiode er 5 år. Den periode kan af bestyrelsen forlænges 1 gang med endnu en periode på indtil 5 år.

Artikel 81

Nedsættelse af udvalgene

1. Hver medlemsstat kan nominere kandidater til medlemskab af udvalget for risikovurdering. Den administrerende direktør udarbejder en liste over nominerede personer, og denne offentliggøres på agenturets websted. Bestyrelsen udpeger udvalgets medlemmer fra denne liste, herunder mindst 1 medlem fra hver medlemsstat, som har nomineret kandidater. Medlemmerne udpeges for deres rolle og erfaring med regulering af kemikalier og/eller for deres tekniske og videnskabelige ekspertise med hensyn til revidering af risikovurderinger for stoffer.

2. Hver medlemsstat kan nominere kandidater til medlemskab af udvalget for samfundsøkonomisk analyse. Den administrerende direktør udarbejder en liste over nominerede personer, og denne offentliggøres på agenturets websted. Bestyrelsen udpeger udvalgets medlemmer fra denne liste, herunder mindst 1 medlem fra hver medlemsstat, som har nomineret kandidater. Medlemmerne udpeges for deres rolle og erfaring med regulering af kemikalier og/eller for deres ekspertise med hensyn til samfundsøkonomiske analyser.

3. Medlemsstaterne udpeger hver 1 medlem til medlemsstatsudvalget.

4. Udvalgene skal bestræbe sig på at have en bred vifte af relevant ekspertise blandt medlemmerne. Med henblik herpå kan udvalgene ved selvsupplering udpege op til fem medlemmer mere, der udvælges på grundlag af deres særlige kvalifikationer.

   Udvalgenes medlemmer udpeges for en treårig periode, som kan fornyes.

   Udvalgsmedlemmerne i alle udvalgene kan lade sig ledsage af videnskabelige, tekniske eller lovgivningsmæssige rådgivere.

   Den administrerende direktør eller dennes repræsentant samt repræsentanter for Kommissionen har ret til at overvære alle møder i udvalgene og i alle arbejdsgrupper, der oprettes af agenturet eller dets udvalg. Berørte parter kan også inviteres til at deltage i møder som observatører på anmodning af udvalgsmedlemmer eller bestyrelsen.

5. De medlemmer i udvalgene, der er udpeget efter at være nomineret af en medlemsstat, sikrer, at der foregår en passende koordinering mellem agenturets opgaver og arbejdet i den kompetente myndighed i deres medlemsstat.

6. Udvalgsmedlemmerne støttes af de videnskabelige og tekniske ressourcer, der er til rådighed for medlemsstaterne. Med henblik herpå stiller medlemsstaterne tilstrækkelige videnskabelige og tekniske ressourcer til rådighed for de udvalgsmedlemmer, som de har udpeget. Alle de kompetente myndigheder i medlemsstaterne fremmer udvalgenes og deres arbejdsgruppers aktiviteter.

7. Medlemsstaterne må ikke give medlemmer af udvalget for risikovurdering eller udvalget for samfundsøkonomisk analyse eller deres videnskabelige og tekniske rådgivere og eksperter instrukser, som er uforenelige med disse personers individuelle opgaver eller med agenturets opgaver, ansvar og uafhængighed.

8. Under udarbejdelsen af en udtalelse skal hvert udvalg gøre sit yderste for at nå til enighed. Hvis en sådan enighed ikke kan opnås, består udtalelsen af flertallet af

medlemmernes holdning samt mindretalsholdningen/-holdningerne og begrundelserne herfor.

9. Hvert udvalg fastsætter selv sin forretningsorden.

Denne forretningsorden skal navnlig omfatte procedurer for udpegelse og supplering af formanden, supplering af medlemmer, procedurer for uddelegering af visse opgaver til arbejdsgrupper, nedsættelse af arbejdsgrupper samt etablering af en procedure for hastevedtagelse af udtalelser. For så vidt angår medlemsstatsudvalget skal formanden være en ansat i agenturet.

Forretningsordenen træder i kraft, når Kommissionen og bestyrelsen har afgivet en positiv udtalelse.

Artikel 82
Oprettelse af forummet

1. Hver medlemsstat udpeger et medlem til forummet for en periode på tre år. Denne periode kan fornyes. Medlemmerne vælges ud fra deres rolle og erfaring med håndhævelse af kemikalielovgivning, og de skal opretholde relevante kontakter til de kompetente myndigheder i medlemsstaten.

Forummet skal bestræbe sig på at have en bred vifte af relevant ekspertise blandt medlemmerne. Med henblik herpå kan forummet ved selvsupplering udpege op til fem medlemmer mere, der vælges på grundlag af deres særlige kvalifikationer. Disse medlemmer udpeges for en treårig periode, som kan fornyes.

Forummets medlemmer kan lade sig ledsage af videnskabelige og tekniske rådgivere.

Agenturets administrerende direktør eller dennes repræsentant samt repræsentanter for Kommissionen har ret til at overvære alle møder i forummet og dets arbejdsgrupper. Involverede parter kan også inviteres til at deltage i møder som observatører på anmodning af medlemmer af forummet eller bestyrelsen.

2. De medlemmer i forummet, der er udpeget af en medlemsstat sikrer, at der foregår en passende koordinering mellem forummets opgaver og arbejdet i den kompetente myndighed i deres medlemsstat.

3. Medlemmerne i forummet støttes af de videnskabelige og tekniske ressourcer, der er til rådighed for de kompetente myndigheder i medlemsstaterne. Alle de kompetente myndigheder i medlemsstaterne fremmer forummets og dets arbejdsgruppers aktiviteter. Medlemsstaterne må ikke give forummets medlemmer eller deres videnskabelige og tekniske rådgivere og eksperter instruktioner, som er uforenelige med disse personers individuelle opgaver eller med forummets opgaver og ansvar.

4. Forummet fastsætter selv sin forretningsorden.

Denne forretningsorden skal navnlig fastsætte procedurer for udpegelse og supplering af formanden, supplering af medlemmer samt procedurerne for uddelegering af visse opgaver til arbejdsgrupper.

Forretningsordenen træder i kraft, når Kommissionen og bestyrelsen har afgivet en positiv udtalelse.

Artikel 83
Udvalgenes rapportører og brug af eksperter

1. Når et udvalg i henhold til artikel 73 skal afgive en udtalelse eller tage stilling til, om et medlemsstat-dossier er i overensstemmelse med kravene i bilag XIV, udpeger det et af medlemmerne som rapportør. Det pågældende udvalg kan udpege et andet medlem til medrapportør. I begge tilfælde forpligter rapportører og medrapportører sig til at handle i Fællesskabets interesse, og de skal afgive en skriftlig erklæring om, at de forpligter sig til at udføre deres pligter, samt en skriftlig interesseerklæring. Et medlem af et udvalg må ikke udpeges til rapportør for en bestemt sag, hvis vedkommende angiver interesser, der kan være til ugunst for en uafhængig behandling af den pågældende sag. Det pågældende udvalg kan på ethvert tidspunkt udskifte rapportøren eller medrapportøren med et andet af udvalgets medlemmer, hvis f.eks. vedkommende ikke er i stand til at udføre sine forpligtelser inden for de fastsatte tidsfrister, eller hvis man konstaterer en interesse, der potentielt kan have en skadelig invirkning.

2. Medlemsstaterne fremsender agenturet navne på eksperter med dokumenteret erfaring i revidering af kemiske risikovurderinger og/eller samfundsøkonomiske analyser eller anden relevant videnskabelig ekspertise, som vil kunne deltage i udvalgenes arbejdsgrupper, og de angiver deres kvalifikationer og særlige ekspertiseområder.

   Agenturet fører en ajourført liste over eksperter. Listen omfatter de eksperter, der er omhandlet i første afsnit, samt andre eksperter, der er identificeret direkte af sekretariatet.

3. Levering af tjenester af udvalgsmedlemmer eller eventuelle eksperter i udvalgenes arbejdsgrupper eller i forummet samt udførelse af alle andre opgaver for agenturet skal være underlagt en skriftlig kontrakt mellem agenturet og den pågældende person eller, hvor dette er relevant, mellem agenturet og den pågældende persons arbejdsgiver.

   Den pågældende person eller dennes arbejdsgiver aflønnes efter en gebyrskala, der indgår i de af bestyrelsen vedtagne finansieringsbestemmelser. Hvis den pågældende person ikke opfylder sine forpligtelser, er den administrerende direktør berettiget til at afslutte eller ophæve kontrakten eller tilbageholde betaling.

4. Tjenesteydelser af videnskabelig karakter, hvor der er flere potentielle tjenesteydere, kan gøres til genstand for en indkaldelse af interessetilkendegivelser, hvis de videnskabelige og tekniske forhold taler til fordel herfor, og hvis det er i overensstemmelse med agenturets opgaver, navnlig nødvendigheden af at sikre et højt niveau af beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet.

   Bestyrelsen vedtager efter forslag fra den administrerende direktør procedurerne i den forbindelse.

5. Agenturet kan anvende eksperter til udførelse af andre særlige opgaver, som det er ansvarligt for.

Artikel 84

Medlemmer af udvalg og bestyrelse - interesseforhold og kvalifikationer

1. Medlemskab af udvalgene og forummet vil blive offentliggjort. Enkeltmedlemmer kan anmode om, at deres navne ikke offentliggøres, hvis de mener, at sådan offentliggørelse kan indebære en risiko for dem. Den administrerende direktør afgør, om en sådan anmodning skal efterkommes. Ved offentliggørelsen af de enkelte udnævnelser angives hvert enkelt medlems faglige kvalifikationer.

2. Bestyrelsens medlemmer, den administrerende direktør og medlemmerne af udvalgene og forummet afgiver en erklæring om, at de forpligter sig til at udføre deres pligter samt en erklæring om interesseforhold, der kan være til skade for deres uafhængighed. Disse erklæringer, der skal være skriftlige, afgives hvert år.

3. På hvert møde skal medlemmerne af bestyrelsen, den administrerende direktør, medlemmer af udvalgene og forummet samt eventuelle eksperter, der deltager i mødet, oplyse om ethvert interesseforhold, der kan anses for at være skadeligt for deres uafhængighed med hensyn til et punkt på dagsordenen. Enhver, der oplyser om et sådant interesseforhold, deltager hverken i behandlingen af de pågældende punkter på dagsordenen eller en afstemning om disse.

Artikel 85

Oprettelse af appeludvalget

1. Appeludvalget består af en formand og to andre medlemmer.

2. Formanden og de to medlemmer skal have suppleanter, som repræsenterer dem, hvis de er fraværende.

3. Formanden, de andre medlemmer og suppleanterne udnævnes af bestyrelsen på grundlag af deres relevante erfaring og ekspertise inden for kemisk sikkerhed, naturvidenskab eller reguleringsprocedurer og juridiske procedurer ud fra en liste af kvalificerede kandidater vedtaget af Kommissionen.

4. De kvalifikationer, der kræves af medlemmerne af appeludvalget, fastlægges af Kommissionen i henhold til den i artikel 130, stk. 2, omhandlede procedure.

5. Formanden og medlemmerne har samme stemmerettigheder.

Artikel 86

Medlemmer af appeludvalget

1. Medlemmerne af appeludvalget, herunder formanden og suppleanterne, har en mandatperiode på 5 år. Denne periode kan forlænges 1 gang.

2. Medlemmerne af appeludvalget skal være uafhængige. Når de træffer afgørelser, må de ikke være bundet af instruktioner.

3. Medlemmerne af appeludvalget må ikke udføre andre opgaver i agenturet. Medlemsfunktionen kan være en deltidsfunktion.

4. Medlemmerne af appeludvalget kan ikke fjernes hverken fra deres hverv eller fra listen i løbet af deres mandatperiode, medmindre der er alvorlige grunde til sådan fjernelse, og Kommissionen efter indhentelse af bestyrelsens udtalelse træffer afgørelse herom.

5. Medlemmerne af appeludvalget må ikke deltage i behandlingen af en appel, hvis de har en personlig interesse i denne, eller hvis de tidligere har været involveret som repræsentanter for en af sagens parter, eller hvis de har været med til at træffe den afgørelse, som appellen vedrører.

6. Hvis et medlem af appeludvalget af de grunde, der er nævnt i stk. 5, mener at han ikke kan deltage i behandlingen af en appel, underretter han appeludvalget herom. Enhver part i appelsagen kan gøre indsigelser mod udvalgsmedlemmerne med henvisning til en hvilken som helst af de grunde, der er nævnt i stk. 5, eller hvis de mistænkes for partiskhed. Indsigelser kan ikke begrundes med medlemmernes nationalitet.

7. Appeludvalget træffer uden deltagelse af det berørte medlem afgørelse om, hvad der skal foretages i de tilfælde, der er omhandlet i stk. 5 og 6. Med henblik på at træffe denne afgørelse, erstattes det pågældende medlem i appeludvalget af en suppleant.

Artikel 87
Afgørelser, der kan appelleres

1. Der kan appelleres mod afgørelser truffet af agenturet i henhold til artikel 7, artikel 18, artikel 25, stk. 4, tredje afsnit, artikel 28, stk. 2, første afsnit, artikel 49, artikel 115, stk. 4, eller artikel 116.

2. En appel indgivet i henhold til stk. 1 har opsættende virkning.

Artikel 88
Appelberettigede - frister og formkrav

1. Enhver fysisk eller juridisk person kan appellere mod en afgørelse henvendt til den pågældende person.

2. Appellen samt angivelse af grundene for denne skal indsendes skriftligt til agenturet inden 1 måned efter, at den berørte person er blevet underrettet om afgørelsen, eller hvis han ikke er blevet dette, efter den dag, hvor han fik kendskab til den, medmindre andet er fastsat i denne forordning.

Artikel 89
Behandling og afgørelse af appelsager

1. Appeludvalget tager inden 30 dage efter indgivelse af appellen i overensstemmelse med artikel 88, stk. 2, stilling til om denne er velbegrundet. Parterne i appelsagen er berettigede til at komme med mundtlige indlæg i denne procedure.

2. Appeludvalget kan udøve enhver beføjelse, som ligger inden for agenturets kompetenceområde.

Artikel 90

Indbringelse af sager for De Europæiske Fællesskabers Domstol

1. En sag kan indbringes for De Europæiske Fællesskabers Domstol i henhold til artikel 230 i traktaten, for at anfægte en afgørelse truffet af appeludvalget, eller i tilfælde hvor der ikke kan appelleres til udvalget, af agenturet.

2. Hvis agenturet ikke træffer en afgørelse kan der anlægges et passivitetssøgsmål ved De Europæiske Fællesskabers Domstol i henhold til traktatens artikel 232.

3. Agenturet træffer de nødvendige foranstaltninger for at efterkomme den afgørelse, der træffes af De Europæiske Fællesskabers Domstol.

Artikel 91

Klager til den europæiske ombudsmand

Alle unionsborgere og alle fysiske og juridiske personer, der har bopæl eller hjemsted i en medlemsstat, har ret til i henhold til traktatens artikel 195 at klage til den europæiske ombudsman over påståede tilfælde af dårlig administration i forbindelse med agenturets aktiviteter.

Artikel 92

Interessekonflikter med andre organer

1. Agenturet bestræber sig på tidligt at identificere potentielle kilder til konflikt mellem dets udtalelser og udtalelser fra andre organer oprettet i medfør af fællesskabsretten, herunder fællesskabsagenturer som f.eks. Den Europæiske Fødevare-sikkerhedsautoritet og Det Europæiske Agentur for Lægemiddelvurdering, samt videnskabelige udvalg som f.eks. Den Videnskabelige Komité for Toksicitet, Økotoksicitet og Miljø (CSTEE) og Den Videnskabelige Komité for Kosmetiske Produkter og andre Forbrugsvarer end Levnedsmidler (SCCNFP), der udfører lignende opgaver i forbindelse med spørgsmål af fælles interesse.

2. Hvis agenturet identificerer en potentiel kilde til uoverensstemmelse, retter det henvendelse til det pågældende organ for at sikre, at alle relevante videnskabelige eller tekniske oplysninger udveksles, og at de videnskabelige eller tekniske spørgsmål, der kan give anledning til strid, identificeres.

3. Hvis der identificeres en grundlæggende konflikt om videnskabelige eller tekniske spørgsmål, og det pågældende organ er et fællesskabsagentur eller et videnskabeligt udvalg, skal agenturet og det pågældende organ samarbejde med henblik på enten at løse konflikten eller at forelægge Kommissionen et fælles dokument, hvori der redegøres nærmere for de omtvistede videnskabelige eller tekniske spørgsmål.

Artikel 93
Agenturets budget:

1. Agenturets indtægter består af:

   (a) et tilskud fra Fællesskabet, opført i De Europæiske Fællesskabers almindelige budget (sektionen vedrørende Kommissionen)

   (b) de gebyrer, som virksomhederne betaler

   (c) eventuelle frivillige bidrag fra medlemsstaterne.

2. Agenturets udgifter omfatter personaleudgifter, administrative udgifter, infrastruktur-udgifter og driftsomkostninger.

3. Inden den 15. februar hvert år udarbejder direktøren et foreløbigt budgetudkast vedrørende driftsudgifterne og det planlagte arbejdsprogram for det følgende regnskabsår og forelægger dette foreløbige udkast for bestyrelsen sammen med en stillingsfortegnelse.

4. Indtægter og udgifter skal balancere.

5. Hvert år udarbejder bestyrelsen på grundlag af et udkast opstillet af den administrerende direktør et overslag over agenturets indtægter og udgifter det følgende finansår. Bestyrelsen fremsender dette overslag, som skal omfatte et udkast til stillingsfortegnelse, til Kommissionen senest den 31. marts.

6. Overslaget fremsendes af Kommissionen til Europa-Parlamentet og Rådet, herefter benævnt "budgetmyndigheden", sammen med De Europæiske Fællesskabers foreløbige budgetforslag.

7. På grundlag af overslaget opstiller Kommissionen i budgetforslaget for De Europæiske Fællesskaber de overslag, som den anser for nødvendige for stillingsfortegnelsen og det tilskudsbeløb, der skal afholdes over det almindelige budget, og dette forelægges budgetmyndigheden i henhold til traktatens artikel 272.

8. Bevillingerne til tilskuddet til agenturet godkendes af budgetmyndigheden.

   Agenturets stillingsfortegnelse vedtages af budgetmyndigheden.

9. Agenturets budget vedtages af bestyrelsen. Det bliver endeligt, når De Europæiske Fællesskabers almindelige budget vedtages endeligt. Det justeres i givet fald i overensstemmelse med dette.

10. Enhver ændring af budgettet, herunder stillingsfortegnelsen, foretages efter proceduren i stk. 5.

11. Bestyrelsen underretter så tidligt som muligt budgetmyndigheden, hvis den har til hensigt at gennemføre et projekt, som kan få betydelige finansielle virkninger for finansieringen af dens budget, navnlig ethvert projekt vedrørende fast ejendom, som f.eks. leje eller køb af bygninger. Den underretter Kommissionen herom.

Når en af budgetmyndighedens parter har meddelt, at den agter at fremsætte en udtalelse, sender den bestyrelsen denne inden for en frist på seks uger regnet fra underretningen om projektet.

Artikel 94
Gennemførelsen af agenturets budget

1. Direktøren varetager pligterne som anvisningsberettiget og gennemfører agenturets budget.

2. Agenturets regnskabsfører kontrollerer indgåelse af udgiftsforpligtelser og betaling af alle agenturets udgifter og fastlæggelse og inkassering af alle agenturets indtægter.

3. Senest den 31. marts efter det afsluttede regnskabsår sender agenturets regnskabsfører det foreløbige årsregnskab ledsaget af en beretning om budgetforvaltningen og den økonomiske forvaltning i regnskabsåret til Kommissionens regnskabsfører. Kommissionens regnskabsfører konsoliderer de foreløbige årsregnskaber for institutionerne og de decentraliserede organer i overensstemmelse med artikel 128 i Rådets forordning (EF, Euratom) nr. 1605/2002[54].

4. Senest den 31. marts efter det afsluttede regnskabsår sender Kommissionens regnskabsfører agenturets foreløbige årsregnskab ledsaget af en beretning om budgetforvaltningen og den økonomiske forvaltning i regnskabsåret til Revisionsretten. Beretningen om budgetforvaltningen og den økonomiske forvaltning i regnskabsåret sendes også til Europa-Parlamentet og Rådet.

5. Efter modtagelsen af Revisionsrettens bemærkninger til agenturets foreløbige regnskaber i henhold til artikel 129 i forordning (EF, Euratom) nr. 1605/2002, opstiller direktøren under eget ansvar agenturets endelige regnskaber og fremsender dem til bestyrelsen til udtalelse.

6. Bestyrelsen afgiver en udtalelse om agenturets endelige regnskaber.

7. Senest den 1. juli i det efterfølgende år fremsender direktøren det endelige årsregnskab tillige med bestyrelsens udtalelse til Europa-Parlamentet, Rådet, Kommissionen og Revisionsretten.

8. Det endelige regnskab offentliggøres.

9. Direktøren fremsender Revisionsretten et svar på dens bemærkninger senest den 30. september. Dette svar sendes også til bestyrelsen.

10. Europa-Parlamentet giver efter Rådets indstilling inden den 30. april i år N + 2 direktøren decharge for gennemførelsen af budgettet for år N.

---

[54] EFT L 248 af 16.9.2002, s. 1.

Artikel 95
Gebyrer

Strukturen og størrelsen af de gebyrer, der er omhandlet i artikel 93, stk. 1, litra b), fastsættes af bestyrelsen og offentliggøres.

Artikel 96
Bekæmpelse af svig

1. Bestemmelserne i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1073/1999[55] finder ubegrænset anvendelse på agenturet i forbindelse med bekæmpelsen af svig, korruption og andre retsstridige handlinger.

2. Agenturet er underlagt den interinstitutionelle aftale af 25. maj 1999[56] om de interne undersøgelser, der foretages af det europæiske kontor for bekæmpelse af svig (OLAF), og skal straks fastsætte passende bestemmelser, der finder anvendelse på hele dets personale.

3. I finansieringsbestemmelserne samt enhver aftale eller ethvert instrument til gennemførelse heraf fastsættes det udtrykkeligt, at Revisionsretten og OLAF om nødvendigt kan foretage kontrol på stedet hos modtagerne af midler fra agenturet og de organer, som fordeler disse.

Artikel 97
Finansforordning

De finansielle regler, der skal gælde for agenturet, vedtages af bestyrelsen efter høring af Kommissionen. De må ikke afvige fra forordning (EF, Euratom) nr. 2343/2002, medmindre dette er nødvendigt netop for agenturets drift og kun med forudgående accept fra Kommissionens side.

Artikel 98
Agenturets retlige status og hjemsted

1. Agenturet er et fællesskabsorgan og har status som juridisk person. Det har i hver medlemsstat den videstgående rets- og handleevne, som vedkommende stats lovgivning tillægger juridiske personer. Det kan i særdeleshed erhverve og afhænde fast ejendom og løsøre og optræde som part i retssager.

2. Agenturet repræsenteres af dets administrerende direktør.

3. Agenturet får hjemsted i Ispra i Italien.

---

55 EFT L 136 af 31.5.1999, s. 1.
56 EFT L 136 af 31.5.1999, s. 15.

Artikel 99

Agenturets erstatningsansvar

1. Agenturets ansvar i kontraktforhold bestemmes efter den lovgivning, der finder anvendelse på den pågældende aftale. De Europæiske Fællesskabers Domstol har kompetence til at træffe afgørelse i henhold til en voldgiftsbestemmelse, som indgår i en af agenturet indgået aftale.

2. For så vidt angår ansvar udenfor kontraktforhold skal agenturet i overensstemmelse med de almindelige retsgrundsætninger, der er fælles for medlemsstaternes retssystemer, erstatte skader, der er forvoldt af agenturet selv eller af dets ansatte under udøvelsen af deres hverv.

   De Europæiske Fællesskabers Domstol har kompetence til at træffe afgørelse i enhver retstvist, som vedrører erstatning for sådanne skader.

3. De ansattes personlige økonomiske og disciplinære ansvar over for agenturet fastsættes i de ansættelsesvilkår, der gælder for agenturets personale.

Artikel 100

Agenturets privilegier og immuniteter

Protokollen vedrørende De Europæiske Fællesskabers privilegier og immuniteter gælder for agenturet.

Artikel 101

Personalevedtægt og -bestemmelser

1. Agenturets personale er omfattet af de regler og forskrifter, der gælder for tjenestemænd og øvrige ansatte ved De Europæiske Fællesskaber. Agenturet udøver over for personalet de beføjelser, som er overdraget til ansættelsesmyndigheden.

2. Bestyrelsen vedtager de nødvendige gennemførelsesbestemmelser i samråd med Kommissionen.

3. Agenturets personale består af embedsmænd, som midlertidigt udpeges eller på midlertidigt grundlag stilles til rådighed af Kommissionen eller medlemsstaterne, samt af andre ansatte, som agenturet efter behov ansætter til udførelse af sine opgaver.

Artikel 102

Fortrolighedspligt

Medlemmerne af bestyrelsen, udvalgsmedlemmerne og medlemmerne af forummet, eksperterne samt agenturets tjenestemænd og øvrige ansatte har, selv efter at deres hverv er ophørt, pligt til ikke at videregive oplysninger om forhold, som ifølge deres natur er undergivet tavshedspligt.

Artikel 103

Tredjelandes deltagelse

Bestyrelsen kan efter aftale med det relevante udvalg eller forummet invitere repræsentanter for tredjelande til at deltage i agenturets arbejde. Kommissionen fastsætter forinden betingelserne deres for deltagelse.

Artikel 104

International harmonisering og internationale bestemmelser

Bestyrelsen kan efter aftale med det kompetente udvalg eller forummet indbyde repræsentanter for internationale organisationer med interesser i kemikalieregulering til at deltage som observatører i agenturets arbejde. Kommissionen fastsætter forinden betingelserne for deres deltagelse.

Artikel 105

Kontakt til involverede parter og organisationer

Bestyrelsen udvikler efter aftale med Kommissionen hensigtsmæssige kontakter mellem agenturet og repræsentanter for industrien, forbrugerbeskyttelse, arbejdsmiljø og miljøorganisationer. Kontakterne kan omfatte observatørers deltagelse i visse af agenturets aktiviteter på betingelser, der forinden er fastsat af bestyrelsen efter aftale med Kommissionen.

Artikel 106

Åbenhed

For at sikre åbenhed vedtager bestyrelsen efter forslag fra den administrerende direktør og efter aftale med Kommissionen regler om offentlig adgang til retlige, videnskabelige eller tekniske oplysninger om kemikaliers sikkerhed, der ikke er fortrolige.

Artikel 107

Relationer til relevante fællesskabsorganer

1. Agenturet samarbejder med andre fællesskabsorganer for at sikre gensidig støtte med hensyn til udførelsen af deres respektive opgaver, især for at undgå dobbeltarbejde.

2. Efter høring af udvalget for risikovurdering og Den Europæiske Fødevare-sikkerhedsautoritet fastsætter den administrerende direktør procedureregler for stoffer, der anvendes i plantebeskyttelsesmidler. Denne procedure vedtages af bestyrelsen efter aftale med Kommissionen.

   Dette afsnit påvirker ikke på anden måde de beføjelser, som Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet har fået overdraget.

3. Dette afsnit påvirker ikke de beføjelser, som Det Europæiske Agentur for Lægemiddelvurdering har fået overdraget ved forordning (EF) nr. ….

4. Efter at have rådført sig med udvalget for risikovurdering, udvalget for samfundsøkonomisk analyse og Det Rådgivende Udvalg for Sikkerhed og Sundhed på Arbejdspladsen fastlægger den administrerende direktør en procedure med hensyn til spørgsmål, der vedrører beskyttelsen af arbejdstagere. Denne procedure vedtages af bestyrelsen efter aftale med Kommissionen.

   Dette afsnit påvirker ikke de beføjelser, som Det Rådgivende Udvalg for Sikkerhed, og Sundhed på Arbejdspladsen har fået tillagt.

Artikel 108
Formater og software til indsendelse af oplysninger til agenturet

Agenturet fastlægger særlige formater, som det gør gratis tilgængelige, og software-pakker, som det giver adgang til på dets websted, til brug for medlemsstater, producenter, importører eller downstream-brugere ved deres indsendelser til agenturet.

AFSNIT X
FORTEGNELSE OVER KLASSIFICERINGER OG ETIKETTERINGER

Artikel 109
Anvendelsesområde

Dette afsnit finder anvendelse på:

(a) stoffer, der skal registreres af en producent eller importør

(b) stoffer der falder ind under artikel 1 i direktiv 67/548/EØF, og som opfylder kriterierne for klassificering som farlige stoffer i henhold til nævnte direktiv, og som markedsføres enten alene eller i et præparat i højere koncentration end de grænser, der er fastsat i direktiv 1999/45/EF, hvilket medfører at præparatet klassificeres som farligt.

Artikel 110
Forpligtelse til at underrette agenturet

1. Enhver importør eller producent eller gruppe af importører eller producenter, som markedsfører et stof, som falder ind under artikel 109, skal meddele agenturet følgende oplysninger, således at de kan optages i fortegnelsen i overensstemmelse med artikel 111, medmindre de er indsendt som del af registreringen:

   (a) producentens identitet eller identiteten af den importør, der er ansvarlig for at markedsføre stoffet/stofferne

   (b) stoffets/stoffernes identitet, som angivet i punkt 2 i bilag IV

   (c) stoffets/stoffernes fareklassificering ved anvendelse af artikel 4 og 6 i direktiv 67/548/EØF

(d) stoffets/stoffernes deraf følgende fareetikettering ved anvendelse af artikel 23, 24 og 25 i direktiv 67/548/EØF

(e) specifikke koncentrationsgrænser, hvis dette er relevant, som resultat af anvendelsen af artikel 4, stk. 4, i direktiv 67/548/EØF og artikel 4 til 7 i direktiv 1999/45/EF.

2. Ved indsendelsen af disse oplysninger anvender producenten eller importøren det format, der er fastlagt i henhold til artikel 108.

3. Hvis forpligtelsen i stk. 1 resulterer i indførsel af forskellige oplysninger for det samme stof i fortegnelsen, gør anmeldere og registranter deres bedste for at nå til enighed om, hvordan stoffet indføres i fortegnelsen.

4. De oplysninger, der er anført i stk. 1, ajourføres af anmelderen/anmelderne, når

(a) der frembringes nye videnskabelige eller tekniske oplysninger, som fører til en ændring af stoffets klassificering og etikettering

(b) anmeldere og registranter af afvigende indførsler af oplysninger om et enkelt stof når til enighed i overensstemmelse med stk. 3.

Artikel 111

Fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer

1. Agenturet opretter og vedligeholder i form af en database en fortegnelse over klassificeringer og etiketteringer med anførelse af de oplysninger, der er omhandlet i artikel 110, stk. 1, samt af oplysninger indsendt som del af en registrering. Ikke-fortrolige oplysninger i denne database, som anført i artikel 116, stk. 1, skal være offentligt tilgængelige. Agenturet giver anmeldere og registranter, som har indsendt oplysninger om et stof, adgang til andre data om samme stof i fortegnelsen.

Agenturet opdaterer fortegnelsen, når det modtager opdaterede oplysninger i overensstemmelse med artikel 110, stk. 4.

2. Ud over de oplysninger, der er henvist til i stk. 1, registrerer agenturet, hvis det er hensigtsmæssigt, følgende oplysninger ud for hver indførsel af oplysninger:

(a) om der med hensyn til de indførte oplysninger findes en harmoniseret klassificering og etikettering på fællesskabsplan gennem optagelse i bilag I til direktiv 67/548/EØF

(b) om det er indførte oplysninger, som to eller flere anmeldere eller registranter er nået til enighed om

(c) registreringsnummeret/-numrene, hvis et sådant eller sådanne foreligger.

Artikel 112

Harmonisering af klassificering og etikettering

1. Fra ikrafttrædelsen af denne forordning, optages harmoniserede klassificeringer og etiketteringer på fællesskabsniveau kun i bilag I til direktiv 67/548/EØF, hvis de opfylder kriterierne for klassificering som kræftfremkaldende, mutagene eller reproduktionstoksiske i kategori 1, 2 eller 3, eller som et luftbåret allergen. Med henblik herpå, kan de kompetente myndigheder i medlemsstaterne fremsende forslag til agenturet om harmoniseret klassificering og etikettering i overensstemmelse med bilag XIV.

2. Medlemsstatsudvalget udarbejder en udtalelse om forslaget, idet det giver de berørte parter mulighed for at kommentere det. Agenturet fremsender denne udtalelse og eventuelle kommentarer til Kommissionen, som træffer afgørelse i overensstemmelse med artikel 4, stk. 3, i direktiv 67/548/EØF.

Artikel 113

Overgangsordninger

Forpligtelserne i artikel 110 finder anvendelse fra den første frist fastsat i henhold til artikel 21, stk. 1.

AFSNIT XI
INFORMATION

Artikel 114

Rapporter

1. Hvert tiende år fremsender medlemsstaterne Kommissionen en rapport om, hvorledes denne forordning fungerer i deres områder, herunder med hensyn til vurderinger og håndhævelse, i det i henhold til artikel 108 fastlagte format.

   Den første rapport fremsendes dog fem år efter denne forordnings ikrafttrædelse.

2. Hvert tiende år fremsender agenturet en rapport til Kommissionen om, hvorledes denne forordning fungerer.

   Den første rapport fremsendes dog fem år efter meddelelsesdatoen i henhold til artikel 131, stk. 2.

3. Hvert tiende år offentliggør Kommissionen en generel rapport om de erfaringer, der er gjort med denne forordning, herunder de oplysninger, der er omhandlet i stk. 1 og 2.

   Den første rapport offentliggøres dog 6 år efter datoen for meddelelsesdatoen i henhold til artikel 131, stk. 2.

Artikel 115
Adgang til oplysninger

1. I henhold til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) nr. 1049/2001[57] gives der adgang til ikke-fortrolige oplysninger, som er i agenturets besiddelse, og som er indsendt i henhold til denne forordning. Agenturet giver på anmodning adgang til sådanne oplysninger i overensstemmelse med artikel 73, stk. 2, litra d).

2. Hver gang en anmodning om adgang til dokumenter fremsættes over for agenturet i henhold til forordning (EF) nr. 1049/2001, foretager agenturet en høring af den tredjepart, der er truffet bestemmelse om i artikel 4, stk. 4, i forordning (EF) nr. 1049/2001 i overensstemmelse med første og tredje afsnit.

   Agenturet underretter registranten, den potentielle registrant, downstream-brugeren, ansøgeren eller anden berørt tredjepart om denne anmodning. Den berørte part kan inden 30 dage indsende en erklæring, i hvilken han angiver, hvilke af de oplysninger, der er omfattet af anmodningen, han anser for at være kommercielt følsomme, og hvis offentliggørelse vil kunne skade ham kommercielt, og som han derfor ønsker hemmeligholdt fra alle personer bortset fra de kompetente myndigheder, agenturet og Kommissionen. Han anfører i hvert tilfælde en begrundelse.

   En sådan erklæring behandles af agenturet, som på grundlag af begrundelsen afgør, om det kan acceptere denne erklæring, før det træffer afgørelse om, hvorvidt det skal efterkomme anmodningen om adgang til dokumenter. Agenturet underretter den berørte part, som i henhold til artikel 87, 88 og 89 kan appellere enhver afgørelse truffet af agenturet om ikke at acceptere erklæringen til appeludvalget inden for 15 dage efter at den pågældende afgørelse er truffet. En sådan appel har opsættende virkning. Appeludvalget træffer afgørelse om appellen inden for en frist på 30 dage.

3. I henhold til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) nr. 2003/4[58] gives der adgang til ikke-fortrolige oplysninger, som de kompetente myndigheder i medlemsstaterne er i besiddelse af, og som er indsendt i henhold til denne forordning. Medlemsstaterne sikrer, at der etableres et system, i henhold til hvilket enhver berørt part med opsættende virkning kan appellere afgørelser truffet vedrørende adgang til dokumenter.

4. Så længe en appel endnu ikke er afgjort, eller så længde, der stadig kan indgives en appel, holder agenturet og enhver kompetent myndighed i en medlemsstat de pågældende oplysninger fortrolige.

5. Agenturet og enhver kompetent myndighed i en medlemsstat anvender artikel 116 i denne forordning, når de træffer en afgørelse i henhold til henholdsvis artikel 4 i forordning (EF) nr. 1049/2001 og artikel 4 i direktiv 2003/4/EF. Hvis medlemsstater har modtaget oplysninger gennem agenturet, træffer agenturet afgørelse om, hvorvidt der skal gives adgang eller ej i henhold til artikel 4, stk. 4 og 5, i forordning (EF) nr. 1049/2001.

6. Enhver fuldstændig eller delvis afvisning fra agenturets side af anmodninger om adgang til dokumenter i henhold til artikel 8 i forordning (EF) nr. 1049/2001 kan

---

[57] EFT L 145 af 31.5.2001, s. 43.
[58] EUT L 41 af 14.2.2003, s. 26.

appelleres i form af en klage til den europæiske ombudsmand eller appeludvalget i overensstemmelse med artikel 87, 88 og 89.

7. Bestyrelsen vedtager de praktiske gennemførelsesbestemmelser for forordning (EF) nr. 1049/2001 senest seks måneder efter nærværende forordnings ikrafttrædelse.

Artikel 116
Fortrolighed

1. Følgende oplysninger betragtes ikke som fortrolige oplysninger:

   (a) stoffets handelsnavn/handelsnavne

   (b) navn i IUPAC-nomenklatur, for så vidt angår farlige stoffer i henhold til direktiv 67/548/EØF

   (c) stoffets betegnelse i EINECS, hvis relevant

   (d) de fysisk-kemiske data om stoffet samt data om stoffets nedbrydningsvej i miljøet

   (e) resultatet af enhver toksikologisk og økotoksikologisk undersøgelse

   (f) enhver DNEL-værdi (derived no-effect level) eller PNEC-værdi (predicted no-effect concentration) beregnet i overensstemmelse med bilag I

   (g) hvis det er væsentligt for klassificeringen og etiketteringen, stoffernes renhedsgrad og identiteten af urenheder og/eller tilsætningsstoffer, som man ved er farlige

   (h) vejledning i sikker anvendelse i overensstemmelse med punkt 4 i bilag IV

   (i) oplysningerne i sikkerhedsdatabladet, bortset fra navnet på selskabet/-virksomheden, og ikke når oplysningerne anses for fortrolige i medfør af stk. 2

   (j) hvis påkrævet i henhold til bilag VII eller VIII, de analysemetoder, der gør det muligt at følge et farligt stof efter dets indførelse i miljøet og at bestemme menneskers direkte eksponering for dette stof

   (k) det faktum, at der er udført forsøg med hvirveldyr.

2. Følgende oplysninger anses for fortrolige, også selv om der ikke er afgivet en erklæring i henhold til artikel 115, stk. 2:

   (a) detaljerede oplysninger om hele sammensætningen af et præparat

   (b) et stofs eller et præparats nøjagtige anvendelse

   (c) den nøjagtige tonnagemængde af stoffet eller præparatet, som fremstilles eller markedsføres

(d) forbindelserne mellem en producent eller importør og deres downstream-brugere.

I undtagelsestilfælde, hvor der er en umiddelbar risiko for menneskers sundhed, sikkerhed eller miljøet, som f.eks. i nødsituationer, kan agenturet frigive de i dette stykke omhandlede oplysninger.

3. Alle andre oplysninger er tilgængelige i henhold til artikel 115.

Artikel 117
Samarbejde med tredjelande og internationale organisationer

Med forbehold af artikel 115 og 116 kan oplysninger modtaget af agenturet i henhold til denne forordning frigives til staten eller ethvert organ i et tredjeland eller til en international organisation i henhold til en aftale indgået mellem Fællesskabet og den pågældende tredjepart i henhold til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) nr. 304/2003[59] eller i henhold til traktatens artikel 181a, stk. 3, hvis følgende betingelser er opfyldt:

(a) formålet med aftalen er samarbejde om gennemførelse eller styring af lovgivning vedrørende kemikalier, der er omfattet af denne forordning

(b) den pågældende tredjepart beskytter de fortrolige oplysninger i henhold til gensidig aftale.

AFSNIT XII
KOMPETENTE MYNDIGHEDER

Artikel 118
Udpegelse

Medlemsstaterne udpeger den eller de kompetente myndigheder, der skal være ansvarlige for at udføre de opgaver, som de kompetente myndigheder tildeles i henhold til denne forordning, og for samarbejdet med Europa-Kommissionen og agenturet om gennemførelsen af denne forordning. Medlemsstaterne stiller tilstrækkelige ressourcer til rådighed for de kompetente myndigheder til at sætte dem i stand til at udføre deres opgaver rettidigt i henhold til forordning.

Artikel 119
Samarbejde mellem de kompetente myndigheder

De kompetente myndigheder samarbejder med hinanden om udførelsen af deres opgaver i henhold til denne forordning, og de yder de kompetente myndigheder i andre medlemsstater al nødvendig og nyttig støtte med henblik herpå.

---

[59] EUT L 63 af 6.3.2003, s. 1.

Artikel 120

Formidling af oplysninger til offentligheden om stoffers risici

De kompetente myndigheder i medlemsstaterne informerer offentligheden om de risici, som stoffer medfører, hvis dette anses for nødvendigt af hensyn til beskyttelse af menneskers sundhed eller miljøet.

Artikel 121

Andre ansvarsområder, som påhviler de kompetente myndigheder

De kompetente myndigheder skal, udover de vejledende dokumenter, der er leveret af agenturet i henhold til artikel 73, stk. 2, litra f), yde rådgivning til producenter, importører, downstream-brugere og alle andre berørte parter med hensyn til deres respektive ansvar og forpligtelser i henhold til denne forordning.

AFSNIT XIII
HÅNDHÆVELSE

Artikel 122

Medlemsstaternes opgaver

Medlemsstaterne opretholder en ordning med officiel kontrol og andre aktiviteter, der er hensigtsmæssige under hensyntagen til forholdene.

Artikel 123

Sanktioner ved overtrædelse af bestemmelserne

1. Medlemsstaterne fastsætter sanktionsbestemmelser for overtrædelse af bestemmelserne i denne forordning og træffer de nødvendige foranstaltninger for at sikre, at de iværksættes. Disse sanktioner skal være effektive, stå i et rimeligt forhold til overtrædelsen og have afskrækkende virkning. Medlemsstaterne anmelder disse sanktionsbestemmelser til Kommissionen senest 18 måneder efter denne forordnings ikrafttrædelse og giver den omgående besked om enhver ændring af dem.

2. Hvis medlemsstaternes bestemmelser indeholder krav om en bøde, fastsættes bødens størrelse i forhold til alvorligheden og varigheden af overtrædelsen, omfanget af skade i miljøet eller for menneskers sundhed og eventuelle skærpende eller formidlende omstændigheder som f.eks. dyrevelfærd, hvis dette er relevant. Den skal være af en sådan størrelse, at det har en afskrækkende virkning.

Artikel 124

Rapportering

Medlemsstaterne forelægger hvert år inden den 1. juli agenturet en rapport om resultaterne af de officielle kontrolundersøgelser, om den overvågning, der har fundet sted, om de fastsatte bøder og om de øvrige foranstaltninger, der er truffet i det foregående kalenderår i henhold til artikel 122 og artikel 123. Agenturet stiller disse rapporter til rådighed for Kommissionen.

AFSNIT XIV
OVERGANGSBESTEMMELSER OG AFSLUTTENDE BESTEMMELSER

Artikel 125
Klausul vedrørende fri bevægelighed

Medlemsstaterne må ikke forbyde, begrænse eller forhindre fremstilling, import, markedsføring eller anvendelse af et stof alene, i et præparat eller i en artikel, hvis det falder ind under denne forordnings anvendelsesområde og opfylder kravene i denne forordning, og, hvis det er relevant, fællesskabsretsakter vedtaget til gennemførelse af denne forordning.

Artikel 126
Sikkerhedsklausul

1. Hvis en medlemsstat har berettiget grund til at antage, at et stof alene, i et præparat eller i en artikel udgør en risiko for menneskers sundhed eller miljøet, selv om det opfylder kravene i denne forordning, kan den træffe passende foreløbige foranstaltninger. Medlemsstaten underretter omgående Kommissionen, agenturet og de øvrige medlemsstater herom, idet den begrunder sin afgørelse og fremsender de videnskabelige eller tekniske oplysninger, som de foreløbige foranstaltninger er baseret på.

2. Kommissionen træffer afgørelse i henhold til proceduren i artikel 130, stk. 2, inden 90 dage efter at være blevet underrettet af medlemsstaten. Denne afgørelse skal enten:

   (a) godkende de foreløbige foranstaltninger i en periode, som er nærmere angivet i afgørelsen eller

   (b) kræve, at medlemsstaten ophæver den foreløbige foranstaltning.

3. Hvis den foreløbige foranstaltning, i tilfælde af en afgørelse som omhandlet i stk. 2, litra a), består i en begrænsning af markedsføringen eller anvendelsen af et stof, indleder den pågældende medlemsstat Fællesskabets begrænsningsprocedure ved at fremsende agenturet et dossier i overensstemmelse med bilag XIV inden 3 måneder efter datoen for Kommissionens afgørelse.

4. I tilfælde af en afgørelse som omhandlet i stk. 2, litra a), tager Kommissionen stilling til, om det er nødvendigt at tilpasse denne forordning.

Artikel 127
Begrundelse af afgørelser

De kompetente myndigheder, agenturet og Kommissionen angiver en begrundelse for alle afgørelser, som de træffer i henhold til denne forordning.

Artikel 128
Ændring af bilagene

Bilagene kan ændres i overensstemmelse med proceduren i artikel 130, stk. 3.

Artikel 129
Gennemførelsesbestemmelser

Enhver foranstaltning, der er nødvendig for en effektiv gennemførelse af denne forordning vedtages i overensstemmelse med proceduren i artikel 130, stk. 3.

Artikel 130
Udvalgsprocedure

1. Kommissionen bistås af et udvalg, der består af repræsentanter for medlemsstaterne og ledes af en repræsentant for Kommissionen.

2. Når der henvises til dette stykke, finder rådgivningsproceduren i artikel 3 i afgørelse 1999/468/EF anvendelse i overensstemmelse med artikel 7, stk. 3, og artikel 8 i samme afgørelse.

3. Når der henvises til dette stykke, anvendes forskriftsproceduren i artikel 5 i afgørelse 1999/468/EF i overensstemmelse med artikel 7, stk. 3, og artikel 8 i nævnte afgørelse.

4. Det tidsrum, der nævnes i artikel 5, stk. 6, i afgørelse 1999/468/EF, fastsættes til tre måneder.

Artikel 131
Overgangsforanstaltninger vedrørende agenturet

1. Kommissionens varetager agenturets funktioner i perioden efter denne forordnings ikrafttrædelse, indtil disse funktioner overføres til agenturet i henhold til bestemmelserne i stk. 3.

   Navnlig kan Kommissionen udnævne personale og indgå kontrakter på agenturets vegne, idet den derved anvender det budget, der er afsat til agenturet. Dette omfatter udnævnelsen af en person, der varetager funktionen som administrerende direktør, indtil en administrerende direktør udnæves af agenturets bestyrelse i overensstemmelse med artikel 80.

2. Inden 18 måneder efter denne forordnings ikrafttrædelse meddeler agenturets administrerende direktør Kommissionen, at agenturet er rede til at opfylde sine funktioner i henhold til denne forordning.

3. Inden 2 måneder efter modtagelse af den meddelelse, der er omhandlet i stk. 2, eller inden 18 måneder efter ikrafttrædelsen af denne forordning, afhængig af, hvilket tidspunkt der først indtræder, overfører Kommissionen disse funktioner til agenturet.

Artikel 132

Overgangsbestemmelser vedrørende begrænsninger

Inden 18 måneder efter denne forordnings ikrafttrædelse udarbejder Kommissionen om nødvendigt et udkast til ændring af bilag XVI i overensstemmelse med et af følgende:

(a) enhver risikovurdering og anbefalet strategi for risikobegrænsning vedtaget på fællesskabsplan i henhold til artikel 11 i forordning (EØF) nr. 793/93, men for hvilke der endnu ikke er truffet fællesskabsforanstaltninger til begrænsning af risiciene

(b) ethvert forslag, som er fremsendt til de relevante institutioner, men som endnu ikke er vedtaget, vedrørende indførelse af begrænsninger i henhold til direktiv 76/769/EØF.

Artikel 133

Revidering

1. Tolv år efter denne forordnings ikrafttrædelse foretager Kommissionen en revision med henblik på anvendelse af forpligtelsen til at foretage en kemisk sikkerhedsvurdering og dokumentere den i en kemisk sikkerhedsrapport på stoffer, der ikke er omfattet af denne forpligtelse, fordi de ikke er underlagt kravet om registrering, eller er underlagt dette, men fremstilles i mængder på under 1 ton pr. år. På grundlag af denne revidering kan Kommissionen i overensstemmelse med den procedure, der er omhandlet i artikel 130, stk. 3, udvide denne forpligtelse.

2. Kommissionen kan tilpasse artikel 14 og 37 i henhold til den procedure, der er omhandlet i artikel 130, stk. 3, så snart en praktisk og omkostningseffektiv måde til udvælgelse af polymerer til registrering på grundlag af sunde tekniske og gyldige videnskabelige kriterier kan fastlægges, og efter offentliggørelse af en rapport om følgende:

   (a) de risici, som polymerer indebærer i forhold til andre stoffer

   (b) et eventuelt behov for at registrere visse typer af polymerer under hensyntagen til på den ene side konkurrenceevne og innovation og på den anden side sundheds- og miljøbeskyttelse.

3. Den i artikel 114, stk. 3, omhandlede rapport om de erfaringer, der er gjort med denne forordning, skal omfatte en gennemgang af kravene i forbindelse med registrering af stoffer, der kun fremstilles eller importeres i mængder fra 1 til 10 tons pr. år pr. producent eller importør.

   På grundlag af denne gennemgang kan Kommissionen i henhold til den i artikel 130, stk. 3, omhandlede procedure ændre oplysningskravene fastsat i bilag V for stoffer fremstillet eller importeret i mængder på fra 1 til 10 tons pr. år pr. producent eller importør, idet den tager hensyn til den seneste udvikling, f.eks. med hensyn til alternative forsøg og ((Q)SARs - (quantitative) structure activity relationships).

Artikel 134
Ophævelse

Direktiv 76/769/EØF, 91/157/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EØF og 2000/21/EF, samt forordning (EØF) nr. 793/93 og (EF) nr. 1488/94 ophæves.

Henvisninger til de ophævede retsakter gælder som henvisninger til denne forordning.

Artikel 135
Ændring af direktiv 1999/45/EF

Artikel 14 i direktiv 1999/45/EF ophæves.

Artikel 136
Ændring af forordning (EF) nr. …./…[POP-stoffer]

Forordning (EF) nr. .../... ændres som følger:

(1) Artikel 3 og 4 ophæves

(2) i artikel 15, stk. 1, udgår ordene "bilag I, II"

(3) Bilag I og II ophæves.

Artikel 137
Ikrafttrædelse og anvendelse

1. Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

2. Afsnit II og XII finder anvendelse fra den tresindstyvende dag efter denne forordnings ikrafttrædelse.

3. Artikel 81 og 82 finder anvendelse fra den dag, der falder 1 år efter forordningens ikrafttrædelse.

4. Artikel 66 til 70 finder anvendelse fra den dag, der falder 18 måneder efter denne forordnings ikrafttrædelse.

5. Artikel 44, 45 og 46 finder anvendelse fra den dag, der falder 2 år efter denne forordnings ikrafttrædelse.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den .[…]

På Europa-Parlamentets vegne	*På Rådets vegne*
Formand	*Formand*
[...]	*[...]*

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

BEGRUNDELSE

1. INDLEDNING

Direktiv 67/548/EØF om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer, der er ændret og tilpasset den tekniske udvikling, indeholder ikke blot regler om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer, men også regler for, hvorledes nye stoffer skal anmeldes til de kompetente myndigheder i den relevante medlemsstat, inden de markedsføres. En uofficiel konsolideret udgave af direktivet med ændringer og tilpasninger har siden 1. marts 2003 været tilgængelig på webstedet Europa (http://www.europa.eu.int/comm/environment/dansub/home_en.htm#ConsolidatedVersion).

Kommissionen fremlagde i februar 2001 en hvidbog[1] om en strategi for en ny kemikaliepolitik. I denne hvidbog fastlagde Kommissionen de mål, der skal opfyldes for at opnå en bæredygtig udvikling i den kemiske industri inden for rammerne af det indre marked. Hvidbogen omhandler også de vigtigste elementer i en sådan strategi, navnlig oprettelsen af et enhedssystem for alle stoffer (med betegnelsen REACH, som er akronym for Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals, dvs. registrering, vurdering og godkendelse af kemiske stoffer), og at industrien pålægges ansvaret for at frembringe data om stoffernes iboende egenskaber og for at vurdere risiciene i forbindelse med deres anvendelse.

Sideløbende med dette forslag fremlægger Kommissionen nu et forslag[2] til en forordning, der indeholder de generelle principper for kemikaliepolitikken og fastsætter lovkravene og procedurerne i forbindelse med REACH-systemet. Med denne forordning oprettes Det Europæiske Kemikalieagentur, og dets opgaver og ansvarsområder defineres.

Den nye Reach-forordning indfører samme krav til registrering af nye kemikalier som for de eksisterende stoffer, hvilket betyder, at reglerne om anmeldelse af nye kemikalier i direktiv 67/548/EØF skal ophæves. Af årsager, som forklares nedenfor, indeholder Reach-forslaget dog ikke på nuværende tidspunkt regler om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer, hvorfor de relevante dele af direktiv 67/548/EØF fortsat vil finde anvendelse. Direktiv 1999/45/EF om klassificering, emballering og etikettering af farlige præparater vil også fortsat finde anvendelse på klassificering, emballering og etikettering af farlige præparater. Andre dele af fællesskabsretten, f.eks. visse direktiver om beskyttelse af arbejdstagere og det såkaldte Seveso-II-direktiv om risikoen for større uheld i forbindelse med en række industrielle aktiviteter, der bygger på reglerne om klassificering og etikettering i direktiv 67/548/EØF, vil også fortsat finde anvendelse.

Direktiv 67/548/EØF indeholder en række bilag om informationskrav og de prøvningsmetoder, der skal anvendes. Indholdet af disse bilag vil figurere som bilag til REACH-lovgivningen, og de skal derfor ophæves i direktivet. Det vil desuden som følge af vedtagelsen af REACH-lovgivningen være nødvendigt at ændre en lang række henvisninger til både prøvningsmetoder og informationskrav.

Man har som følge af Rio-erklæringen om miljø og udvikling i 1991 udviklet et globalt harmoniseret system for klassificering og etikettering af kemikalier (GHS), der blev vedtaget i juli 2003 af FN's Økonomiske og Sociale Råd.

---

1 KOM(2001) 88 endelig af 27.2.2001.

2 Indsæt henvisning efter Kommissionens vedtagelse.

Europa-Kommissionen, de fleste medlemsstater og en række af de nye medlemsstater har deltaget aktivt i udarbejdelsen af GHS. Det fremgår af handlingsplanen fra Verdenstopmødet i Johannesburg om bæredygtig udvikling i 2002, at der er enighed om "at opfordre landene til at anvende det nye globale harmoniserede system for klassificering og etikettering af kemikalier så hurtigt som muligt, således at det kan være fuldt operationelt fra 2008". Kommissionen har i overensstemmelse med denne enighed til hensigt at foreslå at inkorporere det internationalt aftalte GHS i fællesskabslovgivningen så hurtigt som muligt. GHS er dog først for nylig blevet formelt vedtaget, og da Kommissionen ønsker at foretage en mere dybtegående analyse af, hvilke konsekvenser det vil have for de berørte parter og følgelovgivningen, har den ikke fundet det passende at fremsætte et forslag om indførelse af GHS i fællesskabsretten samtidig med REACH-forslaget. Kommissionen vil derfor fremsætte de nødvendige forslag med henblik på vedtagelse af GHS samtidig med den endelige vedtagelse af REACH-lovgivningen.

2. DIREKTIVETS INDHOLD

Artikel 1

Denne artikel ændrer de artikler i direktiv 67/548/EØF, som kræver en ændring som følge af indførelsen af Reach-lovgivningen. Ændringerne omfatter ophævelsen af de afsnit, der vedrører anmeldelsen af nye kemikalier, og af overflødige definitioner samt af de bilag, der vil blive overført til eller overtaget af den nye lovgivning. Denne artikel ændrer også de relevante henvisninger til de ophævede bilag til bilagene til Reach-forordningen.

Artikel 2

Denne artikel ophæver Kommissionens direktiv 93/67/EØF af 20. juli 1993 om fastsættelse af principperne for vurderingen af risikoen for mennesker og miljø ved stoffer, der anmeldes i overensstemmelse med Rådets direktiv 67/548/EØF[3], da disse principper vil blive indføjet i REACH-forordningen.

Artikel 13 i direktiv 67/548/EØF fritager visse grupper af stoffer fra kravet om anmeldelse. Denne artikel ophæves i medfør af artikel 1 i dette direktiv, og da direktiv 2000/21/EF er en tilpasning af artikel 13 i direktiv 67/548/EØF, skal det ligeledes ophæves.

Artikel 3

Medlemsstaterne skal i henhold til denne standardartikel sætte den relevante lovgivning i kraft fra REACH-forordningens ikrafttræden. Medlemsstaterne skal således anvende de to forskellige regelsæt fra samme dato for at undgå juridiske tomrum og enhver retsusikkerhed.

Artikel 4

Denne artikel omhandler direktivets ikrafttræden.

---

[3] EFT L 227 af 8.9.1993, s. 9.

2003/0257 (COD)

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

EUROPA-PARLAMENTET OG RÅDET FOR DEN EUROPÆISKE UNION HAR -

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab, særlig artikel 95,

under henvisning til forslag fra Kommissionen[1],

under henvisning til udtalelse fra Det Europæiske Økonomiske og Sociale Udvalg[2],

under henvisning til udtalelse fra Regionsudvalget[3],

efter proceduren i traktatens artikel 251[4], og

ud fra følgende betragtning:

(1) Med henblik på vedtagelse af Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. [...] af [...] om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier[5] bør der foretages en tilpasning af Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer[6], og bestemmelserne om anmeldelse og risikovurdering i dette direktiv bør ophæves -

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

I direktiv 67/548/EØF foretages følgende ændringer:

(1) I artikel 1, stk. 1, udgår litra a), b) og c).

---

1 EUT C
2 EUT C
3 EUT C
4 EUT C
5 EUT L
6 EFT L 196 af 16.8.1967, s. 1. Direktivet er senest ændret ved Rådets forordning (EF) nr. 807/2003 (EFT L 225 af 21.8.2001, s. 1).

(2) I artikel 2, stk. 1, udgår litra c), d), f) og g).

(3) Artikel 3 affattes således:

"Artikel 3
Prøvning og vurdering af stoffers egenskaber

Forsøg med stoffer i forbindelse med dette direktiv skal udføres i overensstemmelse med kravene i artikel 12 i Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. [...]*.

* EUT L [...]"

(4) I artikel 5 foretages følgende ændringer:

(a) i stk. 1 affattes første afsnit således:

"Medlemsstaterne skal træffe alle nødvendige foranstaltninger til at sikre, at stoffer kun markedsføres alene eller som bestanddele af præparater, såfremt de er emballeret og etiketteret i henhold til artikel 22-25 og kriterierne i bilag VI, og, for så vidt angår registrerede stoffer, i henhold til de oplysninger, der frembringes ved anvendelse af artikel 11 og 12 i forordning (EF) nr. [...], medmindre det drejer sig om præparater, der er omfattet af bestemmelser i andre direktiver".

(b) I stk. 2 ændres "i stk. 1, andet led" til "i stk. 1, første afsnit".

(5) Artikel 7-20 udgår.

(6) I artikel 23, stk. 2, indsættes følgende litra g):

"g) registreringsnummeret, når det foreligger".

(7) Artikel 27 udgår.

(8) Artikel 30 affattes således:

"Artikel 30
Klausul vedrørende fri bevægelighed

Medlemsstaterne kan ikke af grunde, der vedrører klassificering, emballering eller etikettering i dette direktivs betydning, forbyde, begrænse eller hindre markedsføring af stoffer, når disse er i overensstemmelse med dette direktiv".

(9) Artikel 32 udgår.

(10) Bilag V udgår.

(11) I bilag VI foretages følgende ændringer:

(a) i punkt 1.6, 1.6.2, 1.7.2, 1.7.3, 2.1, 2.2.1, 2.2.2, 2.2.2.1, 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5, 3.1.1, 3.1.5.1, 3.1.5.2, 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.5, 3.2.6.1, 3.2.6.2, 3.2.7.2, 3.2.8,

4.2.3.3, 5.1, 5.1.3, 9.1.1.1, 9.1.1.2, 9.3 og 9.5 i bilag VI ændres "bilag V" til "bilag X til forordning (EF) nr. [...]"

(b) i punkt 1.6, litra a), ændres "bilag VII" til "bilag IV, V og VI til forordning (EF) nr. [...]", og "bilag VIII" ændres til "bilag VII og VIII til forordning (EF) nr. [...]".

c) i punkt 5.1 ændres "bilag VII" til "bilag V og VI til forordning (EF) nr. [...]", og "niveau 1 (bilag VIII)" ændres til "bilag VII eller VIII til forordning (EF) nr. [...]"

d) i punkt 5.2.1.2 ændres "niveau 1 (bilag VIII)" til "bilag VII til forordning (EF) nr. [...]"

e) alle andre henvisninger til bilag VIIA, VIIB, VIIC, VIID og VIII skal læses som henvisninger til de tilsvarende bilag IV, V, VI, VII, VIII og IX til forordning (EF) nr. [...].

(12) Bilag VIIA, VIIB, VIIC, VIID og VIII udgår.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og administrative bestemmelser i kraft for at efterkomme dette direktiv senest 60 dage efter ikrafttrædelsen af forordning (EF) nr. [...]. De underretter straks Kommissionen herom.

Disse love og bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne.

2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen de vigtigste nationale retsforskrifter, som de vedtager inden for dette direktivs anvendelsesområde.

Artikel 3

Dette direktiv træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den .[…]

På Europa-Parlamentets vegne
Formand
[...]

På Rådets vegne
Formand
[...]

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER

Bruxelles, den 29.10.2003
KOM(2003) 644 endelig

2003/0256(COD)
2003/0257(COD)

DEL II - Bilag I til IX til forslaget til forordning

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS FORORDNING

om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) {om persistente organiske miljøgifte}

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

(forelagt af Kommissionen)

{SEC(2003) 1171}

INDHOLD

BILAG I ALMINDELIGE BESTEMMELSER OM VURDERING AF STOFFER OG UDARBEJDELSE AF KEMISKE SIKKERHEDSRAPPORTER 5

0. Indledning 5

1. Vurdering af risiko for menneskers sundhed 7

2. Vurdering af risiko som følge af fysisk-kemiske egenskaber 9

3. Miljørisikovurdering 10

4. Vurdering af PBT og vPvB 12

5. Eksponeringsvurdering 13

6. Risikokarakterisering 15

7. Format af den kemiske sikkerhedsrapport 16

BILAG Ia 19

1. identifikation af stof/præparat og af selskab/virksomhed 20

2. Identifikation af farer 21

3. SAMMENSÆTNING/OPLYSNINGER OM BESTANDDELE 21

4. FØRSTEHJÆLPSFORANSTALTNINGER 23

5. BRANDBEKÆMPELSE 23

6. FORHOLDSREGLER VED UDSLIP 23

7. HÅNDTERING OG OPBEVARING 24

8. EKSPONERINGSKONTROL/PERSONLIGE VÆRNEMIDLER 25

9. FYSISKE OG KEMISKE EGENSKABER 26

10. STABILITET OG REAKTIVITET 27

11. TOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER 28

12. MILJØOPLYSNINGER 29

13. BORTSKAFFELSE 30

14. TRANSPORTOPLYSNINGER 31

15. OPLYSNINGER OM FORSKRIFTER 31

16. ANDRE OPLYSNINGER 31

BILAG Ib KEMISKE SIKKERHEDSVURDERINGER FOR PRÆPARATER 33

1. Informationsgrundlag 33

2. Risikovurderinger 33

3. pbt-vurdering 34
4. Eksponeringsvurdering 34
BILAG II UNDTAGELSER FRA REGISTRERINGSPLIGTEN EFTER ARTIKEL 4, STK. 2, LITRA a) 35
BILAG III UNDTAGELSER FRA REGISTRERINGSPLIGTEN EFTER ARTIKEL 4, STK. 2, LITRA b) 40
BILAG IV OPLYSNINGSKRAV OMHANDLET I ARTIKEL 9 41
Trin 1 – indsamling og deling af foreliggende oplysninger 41
trin 2 – vurdering af behovet for oplysninger 41
trin 3 – afdækning af mangler i oplysningerne 41
trin 4 – generering af nye oplysninger/forslag til teststrategi 41
1. almindelige oplysninger om registranten 43
2. identifikation af stoffet 43
3. oplysninger om stoffets (stoffernes) anvendelse(r) 44
4. Klassificering og mærkning 45
5. Vejledning i sikker anvendelse vedrørende: 45
BILAG V OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 1 TON ELLER DEROVER 47
5. oplysninger om stoffets fysisk-kemiske egenskaber 48
6. toksikologiske oplysninger 52
7. økotoksikologiske oplysninger 54
8. andre foreliggende fysisk-kemiske, toksikologiske og økotoksikologiske oplysninger 54
BILAG VI SUPPLERENDE OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 10 TONS ELLER DEROVER 55
6. toksikologiske oplysninger 56
7. økotoksikologiske oplysninger 63
BILAG VII SUPPLERENDE OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 100 TONS ELLER DEROVER 65
5. oplysninger om stoffets fysisk-kemiske egenskaber 66
6. toksikologiske oplysninger 66
7. økotoksikologiske oplysninger 70
9. påvisnings- og analysemetoder 73
BILAG VIII SUPPLERENDE OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 1000 TONS ELLER DEROVER 74
6. toksikologiske oplysninger 75

7. økotoksikologiske oplysninger 77

9. påvisnings- og analysemetoder 79

BILAG IX ALMINDELIGE REGLER FOR TILPASNING AF STANDARDTESTPROGRAMMET I BILAG V-VIII 80

1. Der synes ikke at være videnskabeligt belæg for testning 80

2. Testning er ikke teknisk mulig 83

3. stofspecifik eksponeringsstyret testning 83

BILAG I

ALMINDELIGE BESTEMMELSER OM VURDERING AF STOFFER OG UDARBEJDELSE AF KEMISKE SIKKERHEDSRAPPORTER

0. INDLEDNING

0.1. Formålet med dette bilag er at fastlægge, hvordan producenter og importører skal vurdere og dokumentere, at risiciene forårsaget af det stof, de producerer eller importerer, er tilstrækkeligt styret under dets produktion og deres egen (egne) anvendelse(r), og at andre længere henne i forsyningskæden er i stand til at styre risiciene på betryggende vis.

0.2. Den kemiske sikkerhedsvurdering skal omfatte alle udpegede anvendelser. Den skal dels omfatte stoffet i sig selv (herunder eventuelle vigtige urenheder og tilsætningsstoffer), dels dets anvendelse i et præparat eller i en artikel. Vurderingen skal omfatte hele stoffets livscyklus som fastlagt ved de udpegede anvendelser. Den kemiske sikkerhedsvurdering skal baseres på sammenholdelse af stoffets potentielle negative virkninger med den kendte eller rimeligt forudselige eksponering af mennesker eller og/eller miljø for stoffet.

0.3. Finder producenten eller importøren, at den kemiske sikkerhedsvurdering for ét stof er tilstrækkelig til at vurdere og dokumentere, at risiciene fra et andet stof eller en stofgruppe er tilstrækkeligt styret, kan han anvende denne kemiske sikkerhedsvurdering på det andet stof eller den anden stofgruppe. Fabrikanten eller importøren skal forelægge en begrundelse herfor.

0.4. Den kemiske sikkerhedsvurdering skal baseres på oplysninger om stoffet i den tekniske dokumentation og andre tilgængelige og relevante oplysninger. Foreliggende oplysninger fra vurderinger foretaget i henhold til andre internationale og nationale programmer skal medtages. Når der foreligger en risikovurdering udført i henhold til fællesskabslovgivningen (f.eks. en risikovurdering udført efter forordning 793/93), skal denne vurdering, når det er hensigtsmæssigt, tages i betragtning ved udarbejdelse af den kemiske sikkerhedsrapport, og dette skal fremgå af rapporten. Afvigelser fra sådanne vurderinger skal begrundes.

De oplysninger, der skal tages i betragtning, vedrører således risici ved stoffet, eksponering i forbindelse med produktion eller import, og de udpegede anvendelser af stoffet.

I henhold til bilag IX, afsnit 3 kan det i nogle tilfælde være unødvendigt af skaffe de manglende oplysninger, da de risikostyringsprocedurer, som er nødvendige til at styre en velkarakteriseret risiko, også kan tænkes at være tilstrækkelige til at kontrollere andre potentielle risici, som derfor ikke behøver være nøje karakteriseret.

Når producenten eller importøren for at udarbejde den kemiske sikkerhedsrapport anser det for nødvendigt med yderligere oplysninger, som kun kan skaffes ved udførelse af forsøg i hvirveldyr ifølge bilag VII eller VIII, fremlægger han forslag til en testningsstrategi og forklarer, hvorfor han anser sådanne supplerende oplysninger for nødvendige, og angiver dette under den pågældende overskrift i den kemiske sikkerhedsrapport. Mens resultaterne af yderligere forsøg afventes, angiver han de risikostyringsforanstaltninger, han har iværksat, i den kemiske sikkerhedsrapport.

0.5. Fabrikantens eller importørens kemiske sikkerhedsrapport for et stof skal omfatte følgende trin i henhold til de pågældende afsnit i dette bilag:

1. Vurdering af risiko for menneskers sundhed

2. Vurdering af risiko for menneskers sundhed som følge af fysisk-kemiske egenskaber

3. Vurdering af risiko for miljøet

4. Vurdering af PBT og vPvB

Hvis fabrikanten eller importøren som resultat af trin 1 til 4 konkluderer, at stoffet eller præparatet opfylder kriterierne for at klassificeres som farligt efter direktiv 67/548/EØF eller 1999/45/EF, eller må betegnes som PBT eller vPvB, skal den kemiske sikkerhedsrapport desuden omfatte følgende trin:

5. Eksponeringsvurdering

6. Risikokarakterisering

Alle relevante oplysninger, som har været anvendt til besvarelse af ovennævnte punkter, sammenfattes under den pågældende overskrift i den kemiske sikkerhedsrapport (afsnit 7).

0.6. Hovedelementet i eksponeringsafsnittet i den kemiske sikkerhedsrapport er beskrivelsen af producentens eller importørens eksponeringsscenarie(r) og de(t) eksponeringsscenarie(r), som han anbefaler gennemført med henblik på de(n) udpegede anvendelse(r). Eksponeringsscenarierne indeholder en beskrivelse af de risikostyringsforanstaltninger, som producenten eller importøren har gennemført og anbefaler indført af downstream-brugere. Hvis stoffet bringes på markedet, skal disse eksponeringsscenarier, herunder foranstaltninger til risikostyring, sammenfattes i sikkerhedsdatabladet i overensstemmelse med bilag IA.

0.7. Den nødvendige detaljeringsgrad af beskrivelsen af eksponeringsscenariet varierer betydeligt fra sag til sag og afhænger af stoffets anvendelse og farlige egenskaber samt, hvilke oplysninger producenten eller importøren har til rådighed. Eksponeringsscenarier kan beskrive hensigtsmæssige risikostyringsforanstaltninger til flere forskellige anvendelser af stoffet. Scenarier med engangseksponering kan således omfatte en lang række forskellige anvendelser.

0.8. Under den kemiske sikkerhedsvurdering og udarbejdelse af kemiske sikkerhedsrapporter kan producenten eller importøren anvende en iterativ fremgangsmåde. Iterationen tager på den ene side hensyn til opstilling og revidering af eksponeringsscenariet (-scenarierne), hvorunder risikostyringsforanstaltninger kan formuleres, gennemføres eller anbefales, og på den anden side nødvendigheden af at generere nye oplysninger. Når det nødvendigt at generere yderligere oplysninger, er det for at få en nærmere karakterisering af risiciene gennem en mere finjusteret risikovurdering eller eksponeringsvurdering. På denne måde formidles passende oplysninger i sikkerhedsdatabladet ned gennem forsyningskæden.

0.9. Når oplysninger ikke er obligatoriske i henhold til bilag IX, angives dette under den pågældende overskrift i den kemiske sikkerhedsrapport, og i den tekniske

dokumentation henvises til begrundelsen. Det forhold, at oplysninger ikke er obligatoriske, skal ligeledes angives i sikkerhedsdatabladet.

0.10. For særlige virkninger såsom ozonnedbrydning, hvor procedurerne i afsnit 1 til 6 ikke kan anvendes, skal der ske en individuel risikovurdering i hvert enkelt tilfælde, og producenten eller importøren skal give en fuldstændig beskrivelse og begrundelse vedrørende sådanne vurderinger i den kemiske sikkerhedsrapport og en sammenfatning heraf i sikkerhedsdatabladet.

0.11. Når de i dette bilag beskrevne metoder ikke er egnede, skal alternative metoder beskrives detaljeret og begrundes i den kemiske sikkerhedsrapport.

0.12. Del A af den kemiske sikkerhedsrapport skal indeholde en erklæring om, at producenten eller importøren har gennemført de risikostyringsforanstaltninger, der beskrives i de relevante eksponeringsscenarier med henblik på producentens eller importørens egne anvendelser, og at eksponeringsscenarierne for de udpegede anvendelser er meddelt i sikkerhedsdatabladet til alle kendte brugere længere nede i forsyningskæden.

1. VURDERING AF RISIKO FOR MENNESKERS SUNDHED

1.0. Indledning

1.0.1. Formålet med vurderingen af risiko for menneskers sundhed er:

– at fastlægge stoffets klassificering og mærkning efter direktiv 67/548, og

– at beregne de niveauer for menneskers eksponering for stoffet, som ikke bør overskrides. Dette eksponeringsniveau betegnes det afledte nuleffektniveau (DNEL).

1.0.2. Vurderingen af risiko for menneskers sundhed skal omfatte følgende grupper af potentielle virkninger: (1) toksikokinetik, metabolisme og fordeling, (2) akutte virkninger (akut toksicitet, irritation og ætsende virkning (3) sensibilisering, (4) toksicitet ved gentagen doseringis og (5) CMR-virkninger (carcinogenicitet, mutagenicitet og reproduktionstoksicitet). På grundlag af alle foreliggende oplysninger skal andre virkninger tages i betragtning, når det er nødvendigt.

1.0.3. Risikovurderingen skal bestå af følgende fire trin:

Trin 1. Evaluering af ikke-humane data

Trin 2. Evaluering af humane data

Trin 3. Klassificering og mærkning

Trin 4. Beregning af afledte nuleffektniveauer (DNEL-værdier)

1.0.4. De tre første trin gennemføres for hver virkning, om hvilken der foreligger oplysninger, og skal, når det er nødvendigt og foreskrevet i artikel 29, sammenfattes i sikkerhedsdatabladet i punkt 2 og 11.

1.0.5. For virkninger, om hvilke relevante oplysninger ikke foreligger, anføres i det pågældende afsnit "*Disse oplysninger kræves ikke efter denne forordning. Se begrundelse i …*".

1.0.6. Trin 4 i vurderingen af risiko for menneskers sundhed gennemføres ved samlet behandling af resultaterne af de tre første trin og sammenfattes i punkt 8.1 i den kemiske sikkerhedsrapport.

1.1. Trin 1: Vurdering af ikke-humane data

1.1.1. Vurderingen af ikke-humane data omfatter:

– bestemmelse af risikoen ved den pågældende virkning på grundlag af alle foreliggende ikke-humane data;

– bestemmelse af det kvantitative forhold mellem dosis (koncentration) og respons (virkning).

1.1.2. Kan det kvantitative forhold mellem dosis (koncentration) og respons (virkning) ikke bestemmes, skal dette begrundes, og der foretages en semi-kvantitativ eller kvalitativ analyse. For akutte virkninger kan det kvantitative forhold mellem dosis (koncentration) og respons (virkning) sædvanligvis ikke bestemmes på grundlag af et forsøg udført efter bilag X. I så fald er det tilstrækkeligt at bestemme, om og i hvilket omfang stoffets iboende egenskaber gør det i stand til at fremkalde virkningen.

1.1.3. Alle ikke-humane data, der er anvendt til vurdering af en given virkning på mennesker og til bestemmelse af forholdet mellem dosis (koncentration) og respons (virkning), præsenteres kortfattet, om muligt i form af en eller flere tabeller, hvor der skelnes mellem in vitro-data, in vivo-data og øvrige data. De pågældende forsøgsresultater (f.eks. LD50, NO(A)EL eller LO(A)EL) og forsøgsbetingelser (f.eks. forsøgsvarighed og indgiftsvej) og andre relevante oplysninger angives i internationalt anerkendte måleenheder for den pågældende virkning.

1.1.4 Foreligger der flere undersøgelser vedrørende samme virkning, anvendes normalt de(n) undersøgelse(r), der giver anledning til størst betænkelighed, til at bestemme afledte nuleffektniveauer, og et fyldigt resumé af de(n) pågældende undersøgelse(r) skal indgå i den tekniske dokumentation. Hvis man undlader at anvende de(n) undersøgelse(r), der giver anledning til størst betænkelighed, skal fuld begrundelse herfor gives, og den tekniske dokumentation skal indeholde fyldige undersøgelsesresuméer, ikke kun af den anvendte undersøgelse, men også af alle undersøgelser, der giver anledning til større betænkelighed end den anvendte undersøgelse. For stoffer, for hvilke ingen af de foreliggende undersøgelser peger på nogen risiko, foretages en overordnet vurdering af alle undersøgelsers validitetet.

1.2. Trin 2: Vurdering af humane data

Foreligger der ingen humane data, skal dette afsnit indeholde erklæringen "*Der foreligger ingen humane data*". Hvis der foreligger humane data, skal de præsenteres, om muligt i tabelform.

1.3. Trin 3: Klassificering og mærkning

1.3.1. Korrekt klassificering og mærkning efter kriterierne i direktiv 67/548 angives og begrundes. Der skal altid foretages en sammenholdelse af de foreliggende data med kriterierne i direktiv 67/548 for CMR, kategori 1 og 2, og afgives en erklæring om, hvorvidt stoffet opfylder disse kriterier eller ikke.

1.3.2. Hvis data er utilstrækkelige til at afgøre, om et stof skal klassificeres med henblik på et bestemt end-point, skal registranten angive og begrunde de foranstaltninger eller afgørelser, han har truffet som følge heraf.

1.4. Trin 4: Bestemmelse af afledt nuleffektniveau (DNEL)

1.4.1. På grundlag af resultaterne af trin 1 til 3 for stoffet bestemmes et eller flere afledte nuleffektniveauer, som afspejler eksponeringens forventede vej(e), varighed og hyppighed. Hvis eksponeringsscenarierne berettiger det, kan en enkelt Dnel-værdi være tilstrækkelig. Når de foreliggende data og eksponeringsscenariet (-scenarierne) i punkt 5 i den kemiske sikkerhedsrapport tages i betragtning, kan det dog være nødvendigt at beregne forskellige DNEL-værdier for hver relevant befolkningsgruppe (f.eks. arbejdstagere, forbrugere og personer udsat for indirekte eksponering via miljøet) og eventuelt også for visse befolkningsundergrupper (f.eks. børn, gravide kvinder), samt for forskellige eksponeringsveje. Der gives en komplet begrundelse bl.a. for valget af anvendte data, eksponeringsvej (oral, dermal, inhalation) og varighed og hyppighed af eksponeringen for det stof, som Dnel-værdien skal gælde for. Forventes flere end én eksponeringsvej at gøre sig gældende, bestemmes en Dnel-værdi for hver eksponeringsvej samt for eksponering ad alle veje tilsammen. Ved bestemmelse af Dnel-værdien tages bl.a. følgende faktorer i betragtning:

(i) usikkerheden bl.a. som følge af variabilitet i forsøgsdata og variation inden for og mellem arterne.

(ii) virkningens art og sværhed;

(iii) den befolkningsgruppe, som de kvantitative og/eller kvalitative oplysninger om eksponering gælder for.

1.4.2. Kan en DNEL-værdi ikke fastlægges, skal dette tydeligt angives og fyldestgørende begrundes.

2. VURDERING AF RISIKO SOM FØLGE AF FYSISK-KEMISKE EGENSKABER

2.1. Formålet med vurderingen af risiko som følge af fysisk-kemiske egenskaber er at fastlægge stoffets klassificering og mærkning i henhold til direktiv 67/548.

2.2. De potentielle virkninger for menneskers sundhed skal vurderes i det mindste for følgende fysisk-kemiske egenskaber:

– eksplosionsfarlighed,

– antændelighed,

– oxiderende evne.

Hvis data er utilstrækkelige til at afgøre, om et stof skal klassificeres med henblik på et bestemt end-point, skal registranten angive og begrunde de foranstaltninger eller afgørelser, han har truffet som følge heraf.

2.3. Vurderingen af hver virkning beskrives under det pågældende punkt i den kemiske sikkerhedsrapport (punkt 7) og skal, når det er nødvendigt og foreskrevet i artikel 29, sammenfattes i sikkerhedsdatabladet i punkt 2 og 9.

2.4. For hver fysisk-kemisk egenskab skal vurderingen omfatte en bedømmelse af stoffets iboende evne til at fremkalde virkningen.

2.5. Korrekt klassificering og mærkning efter kriterierne i direktiv 67/548 angives og begrundes.

3. MILJØRISIKOVURDERING

3.0. Indledning

3.0.1. Ved miljørisikovurderingen fastlægges stoffets klassificering og mærkning efter direktiv 67/548, samt den stofkoncentration, under hvilken der ikke forventes negativ virkning på det betragtede delmiljø. Denne koncentration kaldes den forventede nuleffektkoncentration (Pnec).

3.0.2. Miljørisikovurderingen skal omfatte de potentielle virkninger på miljøet, der består af (1) det akvatiske delmiljø (herunder sediment), (2) det terrestriske delmiljø og (3) det atmosfæriske delmiljø, herunder potentielle virkninger, der kan opstå (4) via ophobning i fødekæden. Desuden skal potentielle virkninger på (5) spildevandsbehandlingsanlægs mikrobiologiske aktivitet tages i betragtning. Vurderingen af virkningen på hvert af disse fem delmiljøer beskrives i det pågældende punkt i den kemiske sikkerhedsrapport (punkt 7), og skal, når det er nødvendigt og foreskrevet i artikel 29, sammenfattes i sikkerhedsdatabladet i punkt 2 og 12.

3.0.3. For delmiljøer, om hvilke der ikke foreligger relevante oplysninger, anføres i det pågældende afsnit "Disse oplysninger kræves ikke efter denne forordning. Se begrundelse i …". For delmiljøer, om hvilke der foreligger oplysninger, men for hvilke producenten eller importøren ikke finder det nødvendigt at foretage en risikovurdering, skal producenten eller importøren give en begrundelse under det pågældende punkt i den kemiske sikkerhedsrapport (punkt 7), og, når det er nødvendigt og foreskrevet i artikel 29, en sammenfatning i punkt 12 i sikkerhedsdatabladet.

3.0.4. Risikovurderingen består af følgende tre trin, der hver skal være tydeligt identificeret i den kemiske sikkerhedsrapport:

Trin 1. Evaluering af data

Trin 2. Klassificering og mærkning

Trin 3. Bestemmelse af forventet nuleffektkoncentration (PNEC)

3.1. Trin 1: Dataevaluering

3.1.1. Evalueringen af alle foreliggende data skal omfatte:

– bestemmelse af risiko på grundlag af alle foreliggende data;

– bestemmelse af det kvantitative forhold mellem dosis (koncentration) og respons (virkning).

3.1.2. Kan det kvantitative forhold mellem dosis (koncentration) og respons (virkning) ikke bestemmes, skal dette begrundes, og der foretages en semi-kvantitativ eller kvalitativ analyse.

3.1.3. Alle data, der er anvendt til vurdering af virkningerne på et givet delmiljø, præsenteres kortfattet, om muligt i form af en eller flere tabeller. De pågældende forsøgsresultater (f.eks. LC50 eller NOEC) og forsøgsbetingelser (f.eks. forsøgsvarighed og indgiftsvej) og andre relevante oplysninger angives i internationalt anerkendte måleenheder for den pågældende virkning.

3.1.4. Alle data, der er anvendt til vurdering af stoffets skæbne i miljøet, præsenteres kortfattet, om muligt i form af en eller flere tabeller. De pågældende forsøgsresultater og forsøgsbetingelser og andre relevante oplysninger for den pågældende virkning angives i internationalt anerkendte måleenheder.

3.1.5. Foreligger der flere undersøgelser vedrørende samme virkning, anvendes de(n) undersøgelse(r), der giver anledning til størst betænkelighed, som grundlag for konklusionen, og for de(n) pågældende undersøgelse(r) udarbejdes et fyldigt resumé, som indgår i den tekniske dokumentation. Hvis man undlader at anvende de(n) undersøgelse(r), der giver anledning til størst betænkelighed, skal fuld begrundelse herfor gives, og den tekniske dokumentation skal indeholde fyldige undersøgelsesresuméer, ikke kun af den anvendte undersøgelse, men også af alle undersøgelser, der giver anledning til større betænkelighed end den anvendte undersøgelse. For stoffer, for hvilke ingen af de foreliggende undersøgelser peger på nogen risiko, foretages en overordnet vurdering af alle undersøgelsers validitetet.

3.2. Trin 2: Klassificering og mærkning

3.2.1. Korrekt klassificering og mærkning efter kriterierne i direktiv 67/548 angives og begrundes.

3.2.2. Hvis data er utilstrækkelige til at afgøre, om et stof skal klassificeres med henblik på et bestemt end-point, skal registranten angive og begrunde de foranstaltninger eller afgørelser, han har truffet som følge heraf.

3.3. Trin 3: Bestemmelse af forventet nuleffektkoncentration

3.3.1. På grundlag af de foreliggende data beregnes Pnec for hvert delmiljø. Pnec-værdien kan beregnes ved at anvende en passende beregningsfaktor på de effektværdier (f.eks. LC50 eller NOEC), der er afledt af forsøg med organismer.

Beregningsfaktoren angiver forskellen mellem effektværdier fra laboratorieforsøg for et begrænset antal arter og Pnec for delmiljøet.1.

3.3.2. Kan en Pnec-værdi ikke fastlægges, skal dette tydeligt angives og fyldestgørende begrundes.

4. VURDERING AF PBT OG VPVB

4.0. Indledning

4.0.1. Formålet med vurdering af PBT og vPvB er at bestemme, om stoffet opfylder kriterierne i bilag XII, og i bekræftende fald karakterisere de potentielle emissioner af stoffet. For stoffer, der opfylder PBT- og vPvB-kriterierne, kan der ikke foretages en tilstrækkeligt pålidelig risikovurdering efter punkt 1 og 3 i dette bilag med alle langtidsvirkninger taget i betragtning, eller en vurdering af langtidsudsættelse af mennesker og miljø efter punkt 5 (eksponeringsvurdering), trin 2 (eksponeringsestimering), hvorfor der må foretages en separat PBT- og vPvB-vurdering.

4.0.2. Vurderingen af PBT og vPvB skal baseres på alle oplysninger i den indleverede tekniske dokumentation. Hvis den tekniske dokumentation for et eller flere endpoints kun indeholder oplysninger i henhold til kravene i bilag V og VI, skal registranten overveje, om der må genereres yderligere oplysninger for at opfylde målsætningen for PBT- og vPvB-vurderingen.

4.0.3. PBT- og vPvB-vurderingen skal omfatte følgende to trin, der hver især er tydeligt identificeret i den kemiske sikkerhedsrapports del C, punkt 7:

Trin 1. Sammenholdelse med kriterierne

Trin 2. Karakterisering af emissioner

Vurderingen skal desuden sammenfattes i sikkerhedsdatabladet i punkt 12.

4.1. Trin 1: Sammenholdelse med kriterierne

Denne del af PBT- og vPvB-vurderingen består af en sammenholdelse af de foreliggende data med kriterierne i bilag XII og en erklæring om, hvorvidt stoffet opfylder kriterierne eller ikke. Er de foreliggende data ikke tilstrækkelige til at afgøre, om stoffet opfylder kriterierne i bilag XII, skal andre oplysninger, der giver anledning til tilsvarende betænkelighed, tages i betragtning i hvert enkelt tilfælde.

4.2. Trin 2: Karakterisering af emissioner

Opfylder stoffet kriterierne, foretages en karakterisering af emissionerne, omfattende de relevante dele af eksponeringsvurderingen som beskrevet i punkt 5. Navnlig skal

---

[1] Sædvanligvis gælder, at jo mere omfattende data, der foreligger, og jo længere testvarigheden er, desto mindre bliver usikkerheden og dermed beregningsfaktoren. Der anvendes typisk en beregningsfaktor 1000 til den laveste af tre korttidsværdier L(E)C50 i arter, der repræsenterer forskellige trofiske niveauer, og en faktor 10 til den laveste af tre NOEC-langtidsværdier i arter, der repræsenterer forskellige trofiske niveauer.

karakteriseringen indeholde en vurdering af, hvilke mængder af stoffet der afgives til forskellige delmiljøer under alle aktiviteter, som udøves af producenten eller importøren og ved alle udpegede anvendelser, samt de forventede eksponeringsveje for mennesker og miljø.

5. EKSPONERINGSVURDERING

5.0. Indledning

Formålet med eksponeringsvurderingen er at foretage en kvantitativ eller kvalitativ vurdering af den dosis/koncentration af stoffet, som mennesker og miljø bliver eller kan blive udssat for. Eksponeringsvurderingen skal omfatte følgende to trin, der hver især er tydeligt identificeret i den kemiske sikkerhedsrapport:

Trin 1. Opstilling af eksponeringsscenarier

Trin 2. Eksponeringsestimering

Når det er nødvendigt og foreskrevet i artikel 29, skal vurderingen desuden sammenfattes i et bilag til sikkerhedsdatabladet.

5.1. Trin 1: Opstilling af eksponeringsscenarier

5.1.1. Der opstilles eksponeringsscenarier for produktion i Fællesskabet, for producentens og importørens egen anvendelse samt for alle udpegede anvendelser. Et eksponeringsscenario er det sæt betingelser, der beskriver, hvordan stoffet fremstilles og anvendes gennem sin livscyklus, og hvordan producenten eller importøren kontrollerer eller anbefaler downstream-brugere at kontrollere eksponeringen af mennesker og miljø. Sådanne eksponeringsscenarier kan efter behov være bredt formuleret eller specifikke. Det opstillede eksponeringsscenario skal beskrives under det pågældende punkt i den kemiske sikkerhedsrapport og sammenfattes i et bilag til sikkerhedsdatabladet med en passende kort beskrivelse af anvendelsen. Specielt skal eksponeringsscenariet, når det er relevant, indeholde en beskrivelse af:

– de processer, der indgår i produktionen hos producenten, og, når det er relevant, den videre forarbejdning og anvendelse ved producenten eller importøren, herunder den fysiske form, hvori stoffet produceres, forarbejdes og/eller anvendes;

– de processer, der indgår i den af producenten eller importøren påregnede anvendelse, herunder den fysiske form, hvori stoffet forarbejdes og/eller anvendes;

– de risikostyringsforanstaltninger, som er indført af producenten eller importøren for at reducere eller undgå eksponering af mennesker (herunder arbejdstagere og forbrugere) og af miljøet for stoffet;

– de risikostyringsforanstaltninger, som af producenten eller importøren anbefales indført af downstream-brugere for at reducere eller undgå eksponering af mennesker (herunder arbejdstagere og forbrugere) og af miljøet for stoffet.

– de affaldshåndteringsforanstaltninger, som producenten eller importøren har indført eller anbefaler indført af downstream-brugere eller forbrugere for at reducere eller undgå eksponering af mennesker og miljø for stoffet ved dets bortskaffelse og/eller genanvendelse;

– den arbejdstageraktivitet, som er knyttet til processerne, og varighed og hyppighed af arbejdstagernes eksponering for stoffet;

– forbrugernes aktiviteter og varighed og hyppighed af deres eksponering for stoffet;

– varighed og hyppighed af emissioner af stoffet til de forskellige delmiljøer og spildevandsbehandlingsanlæg, samt fortyndingen i recipientdelmiljøet.

5.1.2. Når vurderingen skal indgå i en ansøgning om godkendelse til en nærmere bestemt anvendelse, behøves kun eksponeringsscenarier for de pågældende anvendelser og de efterfølgende stadier i livscyklusen.

5.2. Trin 2: Eksponeringsestimering

5.2.1. Eksponeringen estimeres for hvert opstillet eksponeringsscenario og beskrives under det pågældende punkt i den kemiske sikkerhedsrapport og sammenfattes, når det er nødvendigt og foreskrevet i artikel 29, i et bilag til sikkerhedsdatabladet. Eksponeringsestimeringen består af tre elementer: (1) emissionsestimering; (2) kemisk skæbne og forløb; og (3) estimering af eksponeringsniveauer.

5.2.2. I emissionsestimeringen medtages emissionerne i alle relevante dele af stoffets livscyklus under forudsætning af, at de i eksponeringsscenariet beskrevne risikostyringsforanstaltninger er indført.

5.2.3. Den mulige nedbrydning og omdannelse eller mulige reaktionsprocesser samt den formodede fordeling og skæbne i miljøet karakteriseres.

5.2.4 Der foretages en estimering af eksponeringsniveauet for alle befolkningsgrupper (arbejdstagere, forbrugere og personer, der kan forventes udsat indirekte gennem miljøet) og delmiljøer, for hvilke eksponeringen for stoffet kendes eller er rimeligt forudselig. Hver relevant eksponeringsvej for mennesker (inhalation, oral og dermal samt kombinationer af alle relevante eksponeringsveje) skal være omfattet. Sådanne skøn skal tage hensyn til variationer i eksponeringsniveauet alt efter tid og sted. Navnlig skal eksponeringsestimeringen tage hensyn til:

– korrekt målte repræsentative eksponeringsdata,

– væsentlige urenheder og tilsætningsstoffer i stoffet,

– den mængde, i hvilken stoffet produceres og/eller importeres,

– den mængde, der er bestemt til hver af de udpegede anvendelser,

– graden af indeslutning,

– stoffets fysisk-kemiske egenskaber,

– omdannelses- og/eller nedbrydningsprodukter,

– de sandsynlige eksponeringsveje og potentialet for optagelse i mennesker,

– de sandsynlige veje til miljøet samt fordeling og nedbrydning og/eller omdannelse i miljøet (se også punkt 3, trin 1).

5.2.5 Når der foreligger korrekt målte repræsentative eksponeringsdata, skal der lægges særlig vægt på dem ved eksponeringsestimeringen. Til estimering af eksponeringsniveau kan anvendes passende modeller. Relevante overvågningsdata for stoffer med analogt anvendelses- og eksponeringsmønster eller analoge egenskaber kan ligeledes tages i betragtning.

6. RISIKOKARAKTERISERING

6.1 For hvert eksponeringsscenario foretages en risikokarakterisering, som beskrives i det pågældende punkt i den kemiske sikkerhedsrapport.

6.2 Risikokarakteriseringen skal omfatte de befolkningsgrupper (der eksponeres som arbejdstagere, forbrugere eller indirekte gennem miljøet og, når det er relevant, en kombination deraf) og delmiljøer, for hvilke eksponeringen for stoffet er kendt eller rimeligt forudsigelig, og skal forudsætte, at de risikostyringsforanstaltninger, der er beskrevet i eksponeringsscenarierne i foregående afsnit, er gennemført. Derudover skal den samlede miljørisiko, som stoffet repræsenterer, opgøres ved at samle resultaterne for alle relevante delmiljøer og alle relevante kilder til emission af stoffet.

6.3 Risikokarakteriseringen består af:

– sammenligning af eksponeringen af hver befolkningsgruppe, som vides eller forventes at blive eksponeret, med de pågældende afledte nuleffektniveauer;

– sammenligning af forventet miljøkoncentration i hvert delmiljø med PNEC-værdien, og

– vurdering af sandsynligheden og sværheden af eventuelle hændelser som indtræder pga. stoffets fysisk-kemiske egenskaber.

6.4 For ethvert eksponeringsscenario kan eksponeringen af mennesker og miljø anses for tilstrækkelig kontrolleret, når:

– de i punkt 6.2 beregnede eksponeringsniveauer ikke overskrider de pågældende DNEL- eller PNEC-værdier, som er bestemt i henholdsvis punkt 1 og 3, og

– sandsynligheden og sværheden af eventuelle hændelser, som indtræder pga. stoffets fysisk-kemiske egenskaber som fastlagt i punkt 2, er ubetydelig.

6.5 For de virkninger på mennesker og delmiljøer, for hvilke der ikke har kunnet bestemmes en DNEL- eller PNEC-værdi, vurderes det kvalitativt, med hvilken sandsynlighed virkningerne kan undgås, når eksponeringsscenariet realiseres.

For stoffer der opfylder kriterierne for PBT og vPvB, skal producenten eller importøren anvende de i punkt 5, trin 2, opnåede oplysninger til i virksomheden at gennemføre risikostyringsforanstaltninger, som minimerer eksponeringen af mennesker og miljø, og til at anbefale sådanne foranstaltninger over for downstream-brugere.

7. FORMAT AF DEN KEMISKE SIKKERHEDSRAPPORT

Den kemiske sikkerhedsrapport skal indeholde følgende punkter:

FORMAT AF DEN KEMISKE SIKKERHEDSRAPPORT

DEL A

1. SAMMENFATNING AF RISIKOSTYRINGSFORANSTALTNINGER

2. ERKLÆRING OM, AT RISIKOSTYRINGSFORANSTALTNINGER ER INDFØRT

3. ERKLÆRING OM, AT RISIKOSTYRINGSFORANSTALTNINGER ER VIDEREFORMIDLET

DEL B

1. IDENTIFIKATION AF STOFFET OG DETS FYSISKE OG KEMISKE EGENSKABER

2. KLASSIFICERING OG MÆRKNING

3. EGENSKABER VEDRØRENDE SKÆBNE I MILJØET

3.1. Nedbrydning

3.2. Fordeling i miljøet

3.3. Bioakkumulering

DEL C

1. VURDERING AF RISIKO FOR MENNESKERS SUNDHED

1.1. Toksikokinetik, metabolisme og fordeling

1.2. Akut toksicitet

1.3. Irritation

1.3.1. *Hud*

1.3.2. *Øjne*

1.3.3. *Luftveje*

1.4. Ætsende virkning

1.5. Sensibilisering

1.5.1. *Hud*

1.5.2. *Luftveje*

1.6. Toksicitet ved gentagen dosering

1.7. Mutagenicitet

1.8. Carcinogenicitet

1.9. Reproduktionstoksicitet

1.9.1. *Virkninger på fertilitet*

1.9.2. *Udviklingstoksicitet*

1.10 Andre virkninger

FORMAT AF DEN KEMISKE SIKKERHEDSRAPPORT

2. VURDERING AF FYSISK-KEMISKE EGENSKABER MED HENBLIK PÅ MENNESKERS SUNDHED

2.1. Eksplosionsfarlighed

2.2. Antændelighed

2.3. Oxiderende evne

3. MILJØRISIKOVURDERING

3.1. Det akvatiske delmiljø (herunder sediment)

3.2. Det terrestriske delmiljø

3.3. Det atmosfæriske delmiljø

3.4. Spildevandsbehandlingsanlægs mikrobiologiske aktivitet

4. VURDERING AF PBT OG VPVB

5. EKSPONERINGSVURDERING

5.1. [Titel på eksponeringsscenario 1]

5.2.1. *Eksponeringsscenario*

5.2.2. *Eksponeringsestimering*

5.2. [Titel på eksponeringsscenario 2]

5.3.1. *Eksponeringsscenario*

5.3.2. *Eksponeringsestimering*

[osv.]

6. RISIKOKARAKTERISERING

6.1. [Titel på eksponeringsscenario 1]

6.1.1. *Menneskers sundhed*

6.1.1.1. *Arbejdstagere*

6.1.1.2. *Forbrugere*

6.1.1.3. *Personer, der udsættes indirekte via miljøet*

6.1.2. *Miljø*

6.1.2.1. *Det akvatiske delmiljø (herunder sediment)*

6.1.2.2. *Det terrestriske delmiljø*

6.1.2.3. *Det atmosfæriske delmiljø*

6.1.2.4. *Spildevandsbehandlingsanlægs mikrobiologiske aktivitet*

6.2. [Titel på eksponeringsscenario 2]

6.2.1. *Menneskers sundhed*

6.2.1.1. *Arbejdstagere*

6.2.1.2. *Forbrugere*

6.2.1.3. *Personer, der er udsættes indirekte via miljøet*

6.2.2. *Miljø*

6.2.2.1. *Det akvatiske delmiljø (herunder sediment)*

6.2.2.2. *Det terrestriske delmiljø*

6.2.2.3. *Det atmosfæriske delmiljø*

6.2.2.4. *Spildevandsbehandlingsanlægs mikrobiologiske aktivitet*

[osv.]

6.x. **Total eksponering (fra alle relevante kilder til emission/udslip tilsammen)**

6.x.1 Menneskers sundhed (for alle eksponeringsveje tilsammen)

6.x.1.1

6.x.2 Miljø (for alle emissionskilder tilsammen)

6.x.2.1

BILAG Ia

RETNINGSLINJER FOR UDARBEJDELSE AF SIKKERHEDSDATABLADE

I dette bilag gives der forskrifter for sikkerhedsdatablade, som udleveres for et stof eller præparat i henhold til artikel 29. Sikkerhedsdatabladet udgør et redskab, hvormed passende oplysninger fra de(n) pågældende kemiske sikkerhedsrapport(er) formidles ned i forsyningskæden til de(n) umiddelbare downstream-bruger(e). De oplysninger, der gives i sikkerhedsdatabladet, skal være i overensstemmelse med oplysningerne i den kemiske sikkerhedsrapport, når denne er obligatorisk. Er der udarbejdet en kemisk sikkerhedsrapport, skal de(t) pågældende eksponeringsscenario (-scenarier) angives i et bilag til sikkerhedsdatabladet for at man lettere kan referere til dem under de pågældende punkter i sikkerhedsdatabladet.

Formålet med dette bilag er at sikre en sådan sammenhæng og præcision i indholdet under de enkelte obligatoriske punkter, der er angivet i artikel 29, at de resulterende sikkerhedsdatablade giver brugeren mulighed for at træffe de foranstaltninger, der er nødvendige af hensyn til sundhed og sikkerhed på arbejdspladsen samt beskyttelse af miljøet.

Oplysningerne i sikkerhedsdatabladene skal desuden opfylde forskrifterne i Rådets direktiv 98/24/EF ([2]) om beskyttelse af arbejdstagernes sikkerhed og sundhed under arbejdet mod risici i forbindelse med kemiske agenser. Specielt skal sikkerhedsdatabladet gøre det muligt for arbejdsgiveren at fastslå, om der findes farlige kemiske agenser på arbejdspladsen, og at vurdere eventuelle risici for arbejdstagernes sikkerhed og sundhed i forbindelse med anvendelse af sådanne agenser.

Oplysningerne i sikkerhedsdatabladet skal være klare og kortfattede. Sikkerhedsdatabladet skal udarbejdes af en ansvarlig person, som tager hensyn til brugernes særlige behov i det omfang, disse kendes. Personer, som markedsfører kemiske stoffer, skal drage omsorg for, at de pågældende ansvarlige har modtaget den nødvendige uddannelse, herunder genopfriskningskurser.

For præparater, der ikke er klassificeret som farlige, men for hvilke der kræves sikkerhedsdatablad efter artikel 30, gives forholdsmæssige oplysninger i hvert punkt.

I betragtning af det brede spektrum af egenskaber af stoffer og præparater kan supplerende oplysninger i visse tilfælde være nødvendige. Hvis det i andre tilfælde viser sig, at oplysninger om visse egenskaber ikke er relevante eller som følge af tekniske forhold ikke kan gives, skal grundene hertil klart anføres i hvert punkt. Der skal gives oplysninger for hver farlig egenskab. Hvis det anføres, at en given risiko ikke gør sig gældende, skal der klart skelnes mellem de tilfælde, hvor den, der foretager klassificeringen, ikke råder over nogen oplysninger, og dem, hvor der foreligger negative forsøgsresultater.

Sikkerhedsdatabladets udstedelsesdato anføres på første side. Når et sikkerhedsdatablad er blevet ændret, skal modtageren gøres opmærksom på de pågældende ændringer.

Bemærkning

Der kræves tillige sikkerhedsdatablade for visse specielle stoffer og præparater (f.eks. metaller i fast form, legeringer, komprimerede gasser osv.), som er opført i kapitel 8 og 9 i

---

[2] EFT L131 af 5.5.1998, s.11

bilag VI til direktiv 67/548/EØF, og for hvilke der er undtagelsesbestemmelser for mærkningen.

1. IDENTIFIKATION AF STOF/PRÆPARAT OG AF SELSKAB/VIRKSOMHED

1.1. Identifikation af stof eller præparat

Den anvendte identifikationsbetegnelse skal være identisk med den, der er anført på emballagens etiket som fastlagt i bilag VI til direktiv 67/548/EØF.

For registreringspligtige stoffer skal betegnelsen være i overensstemmelse med den, der er angivet ved registreringen, og der angives det registreringsnummer, der er tildelt i henhold til artikel 18, stk. 1, i denne forordning.

Hvor der er andre muligheder for identifikation, kan disse anføres.

2.2. Anvendelse af stoffet/præparatet

Anvendelserne af stoffet eller præparatet anføres i det omfang, de kendes. Er der mange mulige anvendelse, anføres kun de vigtigste eller almindeligste anvendelser. Dette skal bestå i en kortfattet beskrivelse af stoffets faktiske funktion, f.eks. flammehæmmende middel, antioxidant osv.

Når der kræves en kemisk sikkerhedsrapport, skal sikkerhedsdatabladet indeholde oplysninger om alle de udpegede anvendelser, der er relevante for modtageren af sikkerhedsdatabladet. Disse oplysninger skal være i overensstemmelse med de udpegede anvendelser og eksponeringsscenarier, der er angivet i bilaget til sikkerhedsdatabladet.

1.3. Identifikation af selskab/virksomhed

Angiv navnet på den ansvarlige for markedsføring i Fællesskabet, det være sig producenten, importøren eller leverandøren. Der angives fuldstændig adresse og telefonnummer for denne ansvarlige.

Er den pågældende person ikke bosiddende i den medlemsstat, hvor stoffet eller præparatet markedsføres, angives om muligt fuldstændig adresse og telefonnummer på den person, som er ansvarlig i den pågældende medlemsstat.

For registranter skal den angivne person svare til de oplysninger om identiteten af producent eller importør, som er givet i registreringen**.**

1.4. Nødopkald

Ud over ovennævnte oplysninger angives nødopkaldsnummer på virksomheden og/eller det relevante officielle rådgivende organ (som kan være det organ, der er ansvarligt for modtagelse af oplysninger om sundhedsmæssige virkninger, jf. artikel 17 i direktiv 1999/45/EF).

2. IDENTIFIKATION AF FARER

Her angives den klassifikation af stoffet eller præparatet, som fremkommer ved brug af klassificeringsreglerne i direktiv 67/548/EØF eller 1999/45/EF. Det anføres kort og klart, hvilke farer stoffet eller præparatet frembyder for mennesker og miljø.

Der skal klart skelnes mellem præparater, der er klassificeret som farlige, og præparater, der ikke er klassificeret som farlige efter direktiv 1999/45/EF.

Der gives en beskrivelse af de vigtigste fysisk-kemiske, sundhedsmæssige og miljømæssige skadevirkninger og symptomer, der kan opstå ved sådan brug og eventuel misbrug af stoffet eller præparatet, og som med rimelighed kan forudses.

Det kan være nødvendigt at nævne sådanne andre farer - f.eks. støvafgivelse, kvælning og forfrysning foruden miljøvirkninger som farer for jordboende organismer osv. - som ikke fører til klassificering, men kan bidrage til den samlede fare ved stoffet.

Oplysningerne på etiketten skal anføres i punkt 15.

Klassificeringen skal være i overensstemmelse med fortegnelsen over klassificering og mærkning i henhold til afsnit X.

3. SAMMENSÆTNING/OPLYSNINGER OM BESTANDDELE

Oplysningerne skal give modtageren mulighed for hurtigt at finde ud af, hvilke farer der er forbundet med det pågældende stof eller præparat. De farer, der er knyttet til selve præparatet, anføres i punkt 3.

3.1. Det er ikke nødvendigt at angive fuldstændig deklaration (indholdsstoffernes art og koncentration), men en generel beskrivelse af indholdsstofferne og deres koncentration kan være nyttig.

3.2. For et præparat, der er klassificeret som farligt efter direktiv 1999/45/EF, skal følgende stoffer angives tillige med deres koncentration eller koncentrationsområde:

(i) stoffer, som udgør en sundheds- eller miljøfare i den i direktiv 67/548/EØF anvendte forstand, hvis de er til stede i en koncentration mindst svarende til:

- værdierne i tabellen i artikel 3, stk. 3, i Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/45/EF, eller
- koncentrationsgrænserne i bilag I til Rådets direktiv 67/548/EØF, eller
- koncentrationsgrænserne i del B i bilag II til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/45/EF, eller
- koncentrationsgrænserne i del B i bilag III til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/45/EF, eller
- koncentrationsgrænserne i den fortegnelse over klassificering og mærkning, der er udarbejdet ifølge afsnit X,

(ii) og stoffer, for hvilke der foreligger EF-grænseværdier for erhvervsmæssig eksponering, og som ikke allerede er omfattet af (i).

3.3. For præparater, der ikke er klassificeret som farlige efter direktiv 1999/45/EF, skal følgende stoffer angives tillige med deres koncentration eller koncentrationsområde, når det enkelte stof findes i en koncentration ≥ 1 % w/w for ikke-gasformige præparater og ≥ 0,2 % v/v for gasformige præparater:

– stoffer, som udgør en sundheds- eller miljøfare i den i direktiv 67/548/EØF anvendte forstand[3],

– og stoffer, for hvilke der findes EF-grænseværdier for erhvervsmæssig eksponering.

3.4. For ovennævnte stoffer anføres klassificering (afledt enten af artikel 4 og 6 i direktiv 67/548/EØF eller bilag I til direktiv 67/548/EØF), dvs. de bogstavsymboler og R-sætninger, som er tilordnet alt efter den fysisk-kemiske, sundhedsmæssige og miljømæssige fare, stofferne frembyder. R-sætningerne behøver ikke angives i deres fulde ordlyd, idet der henvises til punkt 16, hvor den fulde tekst til hver af de R-sætninger, som finder anvendelse, skal være angivet.

3.5. For ovennævnte stoffer angives navn og Einecs- eller Elincs-nummer i overensstemmelse med direktiv 67/548/EØF. CAS-nummer og IUPAC-navn (hvis et sådant foreligger) kan ligeledes være nyttige. For stoffer, som benævnes med et generisk navn i henhold til artikel 15 i direktiv 1999/45/EF eller fodnoten til punkt 3.3 i dette bilag, er det nøjagtige kemiske navn ikke nødvendigt. For registreringspligtige stoffer angives desuden det registreringsnummer, der er tildelt i henhold til artikel 18, stk. 1, i denne forordning.

3.6. Hvis det som anført i artikel 15 i direktiv 1999/45/EF eller fodnoten til punkt 3.3 i dette bilag er nødvendigt at hemmeligholde identiteten for nogle af stofferne, beskrives deres kemiske art, således at de kan håndteres forsvarligt. Der skal anvendes samme navn som det, der fremkommer ved brug af ovennævnte bestemmelser.

---

[3] Kan den, der er ansvarlig for markedsføringen af præparatet, påvise, at angivelse af den kemiske identitet på etiketten eller i sikkerhedsdatabladet for stoffer, der udelukkende er klassificeret som:
- lokalirriterende, med undtagelse af de præparater, hvortil der knyttet risikosætning R 41, eller lokalirriterende i kombination med en eller flere af de i artikel 10, stk. 2.3.4 i direktiv 1999/43/EF nævnte egenskaber, eller;
- sundhedsskadelige i kombination med en eller flere af de i artikel 10, stk. 2.3.4, nævnte egenskaber og alene medfører umiddelbart dødelige virkninger,
vil skade beskyttelsen af oplysninger om hans intellektuelle ejendomsret, kan han i henhold til bestemmelserne i del B af bilag VI til direktiv 1999/45/EF henvise til det pågældende stof enten ved en betegnelse, hvoraf de væsentligste funktionelle kemiske grupper fremgår, eller ved en alternativ betegnelse.

4. FØRSTEHJÆLPSFORANSTALTNINGER

Førstehjælpsforanstaltningerne beskrives.

Det angives, om øjeblikkelig lægehjælp er påkrævet.

Oplysningerne om førstehjælp skal være kortfattede og letforståelige for den skadelidte, de omkringstående og dem, der yder førstehjælp. Symptomer og virkninger angives kortfattet. Af anvisningerne skal det fremgå, hvad der i tilfælde af uheld skal gøres på stedet, og om der kan forventes forsinkede virkninger efter eksponering.

Oplysningerne underinddeles i forskellige underpounkter efter eksponeringsvej, dvs. indånding, kontakt med hud og øjne samt indtagelse.

Det anføres, om lægehjælp er påkrævet eller tilrådes.

For visse stoffer eller præparater kan det være vigtigt at fremhæve, at der skal være særlige midler til specifik øjeblikkelig behandling til rådighed på arbejdspladsen.

5. BRANDBEKÆMPELSE

Med henblik på bekæmpelse af brand, der skyldes det pågældende stof/præparat eller er opstået i dets nærhed, angives:

– passende slukningsmidler

– slukningsmidler, som af sikkerhedsgrunde ikke må anvendes

– særlige farer for eksponering hidrørende fra selve det pågældende stof/præparat, forbrændingsprodukter eller udviklede gasarter

– særlige personlige værnemidler, som skal bæres af brandmandskabet.

6. FORHOLDSREGLER VED UDSLIP

Afhængigt af, hvilket stof/præparat der er tale om, kan det være nødvendigt at give oplysninger om:

– foranstaltninger til beskyttelse af personer, således:

  fjernelse af antændelseskilder, tilstrækkelig ventilation/åndedrætsværn, kontrol med støv, forebyggelse af kontakt med hud og øjne.

– foranstaltninger til beskyttelse af miljøet:

  forhindring af udslip til afløb, overflade- og grundvand samt jorden, eventuelt behov for alarmering af omgivelserne.

– metoder til oprydning, f.eks.:

brug af absorberende materiale (f.eks. sand, kiselgur, syrebindemiddel, universalbindemiddel, savsmuld...), begrænsning af gas-/røgudvikling ved hjælp af vand, fortynding.

Det overvejes desuden, om der er behov for sådanne anvisninger som: "Brug aldrig, neutraliseres med ...".

Bemærkning

Hvis det er hensigtsmæssigt, henvises der til punkt 8 og 13.

7. HÅNDTERING OG OPBEVARING

Bemærkning

Oplysningerne i dette afsnit skal vedrøre beskyttelse af sundhed, sikkerhed og miljø. Det skal bistå arbejdsgiveren med udformning af hensigtsmæssige arbejdsmetoder og organisatoriske foranstaltninger i henhold til artikel 5 i direktiv 98/24/EF.

Når der kræves en kemisk sikkerhedsrapport eller registrering, skal oplysningerne i dette afsnit være i overensstemmelse med de oplysninger, der er givet med henblik på de udpegede anvendelser og eksponeringsscenarier i bilaget til sikkerhedsdatabladet.

7.1. Håndtering

Anfør forholdsregler for sikker håndtering, herunder anvisninger for tekniske foranstaltninger såsom indeslutning, lokal og central ventilation, forholdsregler til hindring af aerosol- og støvdannelse samt brand, og særlige miljøbeskyttelsesforanstaltninger (f.eks. brug af filtre eller scrubbere på udsugningen, anvendelse på inddæmmet areal, forskrifter for indsamling og bortskaffelse af spild osv.) samt eventuelle forskrifter eller regler, der er specifikke for det pågældende stof/præparat (f.eks. arbejdsgange eller udstyr, som er forbudt eller anbefales), om muligt med kortfattet beskrivelse.

7.2. Opbevaring

Anfør sikre opbevaringsforhold, som f.eks. særlig udførelse af lagerlokaler eller -beholdere (herunder isoleringsskalmure og ventilation), uforenelige materialer, opbevaringsbetingelser (grænser eller interval for temperatur og fugtighed, lys, inaktiv gas mv.), særligt elektrisk udstyr og forebyggelse af statisk elektricitet.

Når det er relevant, gives der information om mængdebegrænsning ved opbevaring. Der skal bl.a. gøres opmærksom på eventuelle særlige krav til de materialer, der anvendes som emballage/beholder for stoffet eller præparatet.

7.3. Specifik(ke) anvendelse(r)

For slutprodukter til nærmere bestemt(e) anvendelse(r) skal der være detaljerede, operationelle anbefalinger vedrørende de(n) udpegede anvendelse(r). Om muligt henvises der til godkendte retningslinjer for den pågældende branche eller sektor.

8. EKSPONERINGSKONTROL/PERSONLIGE VÆRNEMIDLER

8.1. Grænseværdier for eksponering

Angiv de konkrete kontrolværdier, der aktuelt finder anvendelse, herunder grænseværdier for erhvervsmæssig eksponering og/eller biologiske grænseværdier. Der anføres værdier for den medlemsstat, hvor stoffet eller præparatet bringes på markedet. Der gives oplysninger om aktuelt anbefalede overvågningsmetoder.

Når der kræves en kemisk sikkerhedsrapport, skal relevante DNEL- og PNEC-værdier for stoffet anføres for de eksponeringsscenarier, der er angivet i bilaget til sikkerhedsdatabladet.

For præparater er det nyttigt angive værdier for de bestanddele, som skal være opført på sikkerhedsdatabladet i henhold til punkt 3.

8.2. Eksponeringskontrol

Her forstås ved eksponeringskontrol alle de beskyttelses- og forebyggelsesforanstaltninger, der skal træffes under brugen for at begrænse eksponeringen af arbejdstagere og miljø.

8.2.1. Foranstaltninger til kontrol af erhvervsmæssig eksponering

Disse oplysninger benyttes af arbejdsgiveren ved vurdering af risikoen for arbejdstagernes sikkerhed og sundhed i forbindelse med det pågældende stof eller præparat i henhold til artikel 4 i direktiv 98/24/EF, hvori der kræves udformning af passende arbejdsprocesser og teknisk kontrol, brug af egnet udstyr og egnede materialer, brug af kollektive beskyttelsesforanstaltninger ved risikokilden og endelig brug af individuelle beskyttelsesforanstaltninger, herunder personlige værnemidler. Der skal derfor gives egnede og tilstrækkelige oplysninger om disse foranstaltninger, således at der kan foretages en behørig risikovurdering i henhold til artikel 4 i direktiv 98/24/EF. Oplysningerne skal supplere dem, som allerede er givet i punkt 7.1.

Er der behov for personlige værnemidler, angives det i detaljer, hvilket udstyr der kan yde tilstrækkelig og hensigtsmæssig beskyttelse. Der tages hensyn til Rådets direktiv 89/686/EØF ([4]) og henvises til de pågældende CEN-standarder.

Når der kræves en kemisk sikkerhedsrapport, gives der en sammenfatning af de risikostyringsforanstaltninger, der giver betryggende kontrol med eksponeringen af arbejdstagere for stoffet ved de eksponeringsscenarier, der er angivet i bilaget til sikkerhedsdatabladet.

8.2.1.1. Åndedrætsværn

For farlige gasser, dampe eller støv angives, hvilken type personlige værnemidler der skal anvendes, som f.eks. luftforsynede åndedrætsværn, passende masker og filtre.

8.2.1.2. Håndværn

Det angives klart, hvilken type handsker der skal benyttes ved håndtering af stoffet eller præparatet, herunder:

---

4 EFT L 399 af 30.12.1989, s. 18

– materialets art,

– handskematerialets gennembrudstid, sammenholdt med omfanget og varigheden af eksponeringen af huden.

Om nødvendigt anføres eventuelle supplerende midler til beskyttelse af hænderne.

8.2.1.3. Øjenværn

Det angives, hvilken type øjenværn der kræves, f.eks. beskyttelsesbriller og ansigtsskærm.

8.2.1.4. Hudværn

Hvis andre dele af kroppen end hænderne skal beskyttes, anføres art og beskaffenhed af personlige værnemidler, f.eks. forklæde, støvler, fuld beskyttelsesdragt. Om nødvendigt angives eventuelle supplerende foranstaltninger til beskyttelse af huden og særlige hygiejniske foranstaltninger.

8.2.2. Foranstaltninger til begrænsning af eksponering af miljøet

Her gives de oplysninger, som arbejdsgiveren har brug for til opfyldelse af sine forpligtelser efter fællesskabslovgivningen for miljøbeskyttelse.

Når der kræves en kemisk sikkerhedsrapport, gives en sammenfatning af de risikostyringsforanstaltninger, der giver betryggende kontrol med eksponeringen af miljøet for stoffet under de eksponeringsscenarier, der er angivet i bilaget til sikkerhedsdatabladet.

9. FYSISKE OG KEMISKE EGENSKABER

For at der kan træffes behørige kontrolforanstaltninger, gives alle relevante oplysninger om stoffet eller præparatet, navnlig oplysningerne i punkt 9.2. Oplysningerne i dette afsnit skal være i overensstemmelse med oplysningerne i registreringen, når en sådan er krævet.

9.1. Generel information

Udseende

Angiv tilstandsform (fast, flydende, gas) og farve af stoffet eller præparatet ved levering.

Lugt

Hvis stoffet har en lugt, gives en kort beskrivelse af denne.

9.2. Vigtige oplysninger om sundhed, sikkerhed og miljø

pH

Der anføres pH-værdi af stoffet eller præparatet ved levering, eller af en vandig opløsning; i sidstnævnte tilfælde angives koncentrationen.

Kogepunkt/kogepunktsinterval:

Flammepunkt:

Antændelighed (fast stof, gas)

Eksplosive egenskaber:

Oxiderende egenskaber:

Damptryk:

Relativ vægtfylde:

Opløselighed:

Vandopløselighed:

Fedtopløselighed (opløsningsmiddel – olie specificeres):

Fordelingskoefficient: n-oktanol/vand:

Viskositet:

Dampes massefylde:

Fordampningshastighed:

9.3. Andre oplysninger

Andre vigtige sikkerhedsparametre anføres, således blandbarhed, ledeevne, smeltepunkt/smeltepunktsinterval, gasgruppe (nyttigt med henblik på Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 94/9/EF) ([5]), selvantændelsestemperatur mv.

Bemærkning 1

Ovennævnte egenskaber bestemmes efter forskrifterne i del A i bilag X eller ved en tilsvarende anden metode.

Bemærkning 2

For præparater skal oplysningerne normalt gives for selve præparatet. Hvis det anføres, at en given risiko ikke er til stede, skal der dog klart skelnes mellem de tilfælde, hvor den, der foretager klassificeringen, ikke råder over nogen oplysninger, og dem, hvor der foreligger negative forsøgsresultater. Anses det for nødvendigt at give oplysninger om egenskaberne af de enkelte bestanddele, bedes det tydeligt angivet, hvad disse data henviser til.

10. STABILITET OG REAKTIVITET

Angiv stoffets eller præparatets stabilitet og muligheden for opståen af farlige reaktioner under visse anvendelsesforhold og ved frigivelse til omgivelserne.

---

[5] EFT L 100 af 19.4.1994, s. 1

10.1. Forhold, som skal undgås

Anfør de forhold som f.eks. temperatur-, tryk-, lys- og stødpåvirkning, der kan fremkalde en farlig reaktion, og giv om muligt en kortfattet beskrivelse.

10.2. Materialer, som skal undgås

Anfør materialer som f.eks. vand, luft, syrer, baser, oxidationsmidler eller eventuelle andre, nærmere angivne stoffer, der kan fremkalde en farlig reaktion, og giv om muligt en kortfattet beskrivelse.

10.3. Farlige nedbrydningsprodukter

Anfør, hvilke farlige stoffer der dannes i farlige mængder ved nedbrydning.

Bemærkning

Specielt vurderes:

– behovet for og tilstedeværelsen af stabilisatorer

– muligheden for farlig eksoterm reaktion

– den eventuelle sikkerhedsmæssige betydning af en ændring i stoffets eller præparatets fysiske udseende

– eventuelle farlige nedbrydningsprodukter, som kan dannes ved kontakt med vand

– muligheden for omdannelse til ustabile nedbrydningsprodukter.

11. TOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

Dette afsnit omhandler behovet for en kortfattet, men fuldstændig og forståelig beskrivelse af de forskellige toksikologiske (sundhedsmæssige) virkninger, som kan opstå, hvis brugeren kommer i kontakt med stoffet eller præparatet.

Oplysningerne skal omfatte sundhedsfarlige virkninger af eksponering for stoffet eller præparatet, f.eks. baseret på forsøgsdata og erfaringer. Endvidere skal der, når det er hensigtsmæssigt, oplyses om forsinkede, øjeblikkelige og kroniske virkninger af korttids- og langtidseksponering som f.eks. sensibilisering, sløvende virkning, carcinogenicitet, mutagenicitet og reproduktionstoksicitet (udviklingstoksicitet og fertilitet). Oplysningerne skal desuden omfatte de forskellige eksponeringsveje (indånding, indtagelse, kontakt med hud og øjne) samt en beskrivelse af de symptomer, der hører sammen med de fysiske, kemiske og toksikologiske egenskaber.

Idet der tages hensyn til de oplysninger, der allerede er givet i punkt 3, "Sammensætning/oplysninger om bestanddele", kan det være nødvendigt at nævne specielle sundhedsvirkninger af visse stoffer i præparatet.

Oplysningerne i dette afsnit skal være i overensstemmelse med de oplysninger, der er givet som led i registreringen, når en sådan er krævet, og/eller i den kemiske sikkerhedsrapport, når en sådan er krævet, og skal omfatte følgende grupper af potentielle virkninger:

– toksikokinetik, metabolisme og fordeling

– akutte virkninger (akut toksicitet, lokalirritation og ætsning)

– sensibilisering

– toksicitet ved gentagen dosering og

– CMR-virkninger (carcinogenicitet, mutagenicitet og reproduktionstoksicitet).

For registreringspligtige stoffer gives der en sammenfatning af de oplysninger, der er givet i medfør af bilag V-IX. Oplysningerne skal desuden omfatte resultatet af sammenholdelsen af de foreliggende data med kriterierne i direktiv 67/548 for CMR, kategori 1 og and 2, jf. punkt 1.3.1 i bilag I.

12. MILJØOPLYSNINGER

Der gives oplysninger om stoffets eller præparatets mulige virkninger, reaktioner og skæbne i luft, vand og/eller jord. Eventuelle relevante forsøgsdata anføres (f.eks. LC50 fisk ≤ 1 mg/l).

Oplysningerne i dette afsnit skal være i overensstemmelse med de oplysninger, der er givet som led i registreringen, når en sådan er krævet, og/eller i den kemiske sikkerhedsrapport, når en sådan er krævet.

Beskriv de vigtigste karakteristika, som kan forventes at påvirke miljøet som følge af stoffets eller præparatets art og sandsynlige anvendelsesmåder. Tilsvarende oplysninger gives for farlige stoffer, som dannes ved nedbrydning af stofferne eller præparaterne. Dette kan bestå af følgende:

12.1. Økotoksicitet

Oplysningerne omfatter foreliggende relevante data om akut og kronisk akvatisk toksicitet i fisk, krebsdyr, alger og andre vandplanter. Derudover angives eventuelt foreliggende toksicitetsdata for mikroskopiske og makroskopiske organismer i jord samt andre miljørelevante organismer som fugle, bier og planter. Når stoffet eller præparatet virker hæmmende på mikroorganismers aktivitet, bør den mulige virkning på spildevandsbehandlingsanlæg omtales.

For registreringspligtige stoffer gives der en sammenfatning af de oplysninger, der er givet i medfør af bilag V-IX.

12.2. Mobilitet

Stoffets eller de pågældende præparatbestanddeles([6]) potentiale for ved udslip i miljøet at blive transporteret til grundvandet eller langt fra udslipsstedet.

De relevante data kan bl.a. omfatte:

– kendt eller forventet fordeling i miljømedierne

---

[6] Disse oplysninger kan ikke gives for præparatet, da de er stofspecifikke. Når sådanne oplysninger foreligger og er hensigtsmæssige, skal de derfor gives for hvert af de af præparatets indholdsstoffer, som skal være opført i sikkerhedsdatabladet i henhold til reglerne i punkt 2.

– overfladespænding

– absorption/desorption.

Vedrørende øvrige fysisk-kemiske egenskaber henvises der til punkt 9.

12.3. Persistens og nedbrydelighed

Stoffets eller de pågældende præparatbestanddeles [6] potentiale for at blive nedbrudt i de pågældende miljømedier, enten gennem biologisk nedbrydning eller andre processer såsom oxidation eller hydrolyse. Halveringstider for nedbrydning skal angives, hvis de foreligger. Stoffets eller de pågældende præparatbestanddeles [6] potentiale for nedbrydning i spildevandsbehandlingsanlæg skal ligeledes angives.

12.4. Bioakkumuleringspotentiale

Stoffets eller de pågældende præparatbestanddeles [6] potentiale for akkumulering i flora og fauna og – til sidst – passere gennem fødekæden, med angivelse af oktanol-vand-fordelingskoefficient (Kow) og biokoncentreringsfaktor (BCF), hvis de foreligger.

12.5. Resultater af PBT-vurdering

Når der kræves en kemisk sikkerhedsrapport, anføres resultaterne af PBT-vurderingen som angivet i den kemiske sikkerhedsrapport.

12.6 Andre negative virkninger

Eventuelle foreliggende oplysninger om andre negative miljøvirkninger medtages, f.eks. potentiale for ozonnedbrydning, fotokemisk ozondannelse, hormonforstyrrende virkning og/eller global opvarmning.

Bemærkninger

Miljørelevante oplysninger skal forefindes under andre punkter i sikkerhedsdatabladet, navnlig anvisninger for kontrolleret udledning, foranstaltninger ved utilsigtet udslip samt foranstaltninger ved transport og bortskaffelse under punkt 6, 7, 13, 14 og 15.

13. BORTSKAFFELSE

Hvis bortskaffelse af det pågældende stof eller præparat (overskud eller affald fra påregnet brug) udgør en fare, gives der en beskrivelse af sådanne rester og oplysninger om sikker håndtering.

Der anføres passende metoder til bortskaffelse af både stoffet eller præparatet og eventuel forurenet emballage (forbrænding, genanvendelse, deponering osv.).

Når der kræves en kemisk sikkerhedsrapport, skal oplysningerne om de affaldshåndteringsforanstaltninger, der giver betryggende kontrol med eksponeringen af mennesker og miljø for stoffet, være i overensstemmelse med eksponeringsscenarierne i bilaget til sikkerhedsdatabladet.

Bemærkning

Der henvises til eventuelle relevante fællesskabsforskrifter vedrørende affald. I mangel heraf er det hensigtsmæssigt at henlede brugerens opmærksomhed på, at der kan gælde nationale eller regionale bestemmelser.

14. TRANSPORTOPLYSNINGER

Anfør særlige forholdsregler, som brugeren skal være bekendt med eller overholde i forbindelse med transport eller befordring enten inden for eller uden for virksomhedens område. Når det er relevant, oplyses transportklassifikation for hvert af regulativerne for de forskellige transportformer: IMDG (skib), ADR (vej, Rådets direktiv 94/55/EF(9)), RID (bane, Rådets direktiv 96/49/EF)(10), ICAO/IATA (luft). Dette kan bl.a. omfatte:

– UN-nummer

– klasse

– betegnelse på forsendelsen

– emballagegruppe

– marin forureningsfaktor

– andre relevante oplysninger.

15. OPLYSNINGER OM FORSKRIFTER

Der anføres de oplysninger vedrørende sundhed, sikkerhed og miljø, som skal angives på etiketten i henhold til direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF.

Er det i sikkerhedsdatabladet omhandlede stof eller præparat omfattet af særlige fællesskabsbestemmelser for beskyttelse af personer og miljø (f.eks. tilladelser meddelt i henhold til afsnit VII eller begrænsninger i henhold til afsnit VIII), skal disse så vidt muligt angives.

I sikkerhedsdatabladet angives desuden den nationale lovgivning, der gennemfører sådanne foranstaltninger, samt eventuelle andre nationale foranstaltninger, som kan være relevante.

16. ANDRE OPLYSNINGER

Der angives eventuelle andre oplysninger, som leverandøren anser for at have betydning for brugerens sundhed og sikkerhed og for beskyttelsen af miljøet, som f.eks.:

– liste over relevante R-sætninger; den fulde ordlyd af eventuelle R-sætninger i sikkerhedsdatabladets punkt 2 og 3 anføres

– rådgivning om uddannelse

– anbefalede anvendelsesbegrænsninger (f.eks. ikke-lovbefalede anbefalinger fra leverandøren)

– yderligere oplysninger (skriftlige referencer og/eller tekniske kontaktorganer)

– kilder til de vigtigste data, der er anvendt ved udarbejdelsen af sikkerhedsdatabladet.

For reviderede sikkerhedsdatablade angives det tydeligt, hvilke oplysninger der er tilføjet, slettet eller revideret (medmindre dette er angivet andetsteds).

BILAG Ib

KEMISKE SIKKERHEDSVURDERINGER FOR PRÆPARATER

For præparater skal den kemiske sikkerhedsvurdering udføres i overensstemmelse med bilag I, med følgende modifikationer:

1. INFORMATIONSGRUNDLAG

Den kemiske sikkerhedsvurdering skal bygge på oplysninger om de enkelte stoffer i præparatet som angivet i den tekniske dokumentation og/eller oplysninger givet af leverandøren i sikkerhedsdatabladet. Den skal desuden bygge på de foreliggende oplysninger om selve præparatet.

2. RISIKOVURDERINGER

Risikovurderinger (menneskers sundhed, menneskers sundhed hvad angår fysisk-kemiske egenskaber samt miljø) udføres i overensstemmelse med punkt 1, 2 og 3 med følgende ændringer:

(a) Med henblik på dataevalueringstrinnet (-trinnene) forelægges alle relevante data vedrørende præparatet, klassificeringen af hvert stof i præparatet og eventuelle særlige koncentrationsgrænser for hvert stof i præparatet.

(b) Med henblik på klassificerings- og mærkningstrinnene skal præparatets klassificering og mærkning i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/45/EF forelægges og begrundes.

(c) Til beregning af afledt nuleffektniveau (Dnel), angives Dnel-værdien for hvert stof i præparatet med behørig henvisning til leverandørens sikkerhedsdatablad, samt den beregnede Dnel-værdi for præparatet, ledsaget af en begrundelse for beregningsmåden. Virkningerne forudsættes at være additive, medmindre der foreligger oplysninger om det modsatte. Dnel-værdierne for præparatet kan da beregnes for hver eksponeringsvej og hvert eksponeringsscenario som et vægtet gennemsnit af Dnel-værdierne for hvert stof i præparatet, idet hvert stof i præparatet vægtes med en brøkdel svarende til, hvor stor en andel eksponeringen for stoffet udgør af den samlede eksponering for alle stoffer i præparatet.

(d) Til beregning af forventet nuleffektniveau (Pnec), angives Pnec-værdien for hvert stof i præparatet med behørig henvisning til leverandørens sikkerhedsdatablad samt den beregnede Pnec-værdi for præparatet, ledsaget af en begrundelse for beregningsmåden. Virkningerne forudsættes at være additive, medmindre der foreligger oplysninger om det modsatte. Pnec-værdierne for præparatet kan da beregnes for hvert delmiljø og hvert eksponeringsscenario som et vægtet gennemsnit af Pnec-værdierne for hvert stof i præparatet, idet hvert stof i præparatet vægtes med en brøkdel svarende til, hvor stor en andel eksponeringen for stoffet udgør af den samlede eksponering for alle stoffer i præparatet.

3. PBT-VURDERING

Indeholder præparatet et stof, der opfylder kriterierne i bilag XII, skal dette angives i den kemiske sikkerhedsrapport.

4. EKSPONERINGSVURDERING

4.1 Formålet med eksponeringsvurderingen er at foretage en kvantitativ eller kvalitativ vurdering af den dosis/koncentration af præparatet, som mennesker og miljø bliver eller kan blive eksponeret for.

4.2 Eksponeringsscenarier skal opstilles i henhold til punkt 5.1 i bilag I. Eksponeringen beregnes for hvert af de opstillede eksponeringsscenarier og for hvert stof i præparatet i overensstemmelse med punkt 5.2 i bilag I.

4.3 Når virkningerne forudsættes additive, beregnes eksponeringsniveauet for præparatet for hver human eksponeringsvej og hvert delmiljø som summen af de beregnede værdier af eksponeringen for hvert stof i præparatet.

BILAG II

UNDTAGELSER FRA REGISTRERINGSPLIGTEN EFTER ARTIKEL 4, STK. 2, LITRA a)

EINECS-nr.	Navn/gruppe	CAS-nr.
200-061-5	D-glucitol $C_6H_{14}O_6$	50-70-4
200-066-2	ascorbinsyre $C_6H_8O_6$	50-81-7
200-075-1	glucose $C_6H_{12}O_6$	50-99-7
200-294-2	L-lysin $C_6H_{14}N_2O_2$	56-87-1
200-312-9	palmitinsyre, kemisk ren $C_{16}H_{32}O_2$	57-10-3
200-313-4	stearinsyre, kemisk ren $C_{18}H_{36}O_2$	57-11-4
200-334-9	sucrose, kemisk ren $C_{12}H_{22}O_{11}$	57-50-1
200-405-4	α-tocopherylacetat $C_{31}H_{52}O_3$	58-95-7
200-432-1	DL-methionin $C_5H_{11}NO_2S$	59-51-8
200-711-8	D-mannitol $C_6H_{14}O_6$	69-65-8
201-771-8	L-sorbose $C_6H_{12}O_6$	87-79-6
204-007-1	oliesyre, kemisk ren $C_{18}H_{34}O_2$	112-80-1
204-664-4	glycerolstearat, kemisk rent $C_{21}H_{42}O_4$	123-94-4
204-696-9	carbondioxid CO_2	124-38-9
205-278-9	calciumpantothenat, D-form $C_9H_{17}NO_5.½Ca$	137-08-6
205-582-1	laurinsyre, kemisk ren $C_{12}H_{24}O_2$	143-07-7
205-590-5	kaliumoleat $C_{18}H_{34}O_2K$	143-18-0
205-756-7	DL-phenylalanin $C_9H_{11}NO_2$	150-30-1
208-407-7	natriumgluconat $C_6H_{12}O_7.$ Na	527-07-1
212-490-5	natriumstearat, kemisk rent $C_{18}H_{36}O_2.$Na	822-16-2
215-279-6	kalksten Et ikke-brændbart fast stof, karakteristisk for sedimentbjergarter. Består primært af calciumcarbonat	1317-65-3
215-665-4	sorbitanoleat $C_{24}H_{44}O_6$	1338-43-8

EINECS-nr.	Navn/gruppe	CAS-nr.
216-472-8	calciumdistearat, kemisk rent $C_{18}H_{36}O_{2.1/2}Ca$	1592-23-0
231-147-0	argon Ar	7440-37-1
231-153-3	carbon C	7440-44-0
231-783-9	nitrogen N_2	7727-37-9
231-791-2	vand, destilleret eller andet vand eller tilsvarende eller højere renhed H_2O	7732-18-5
231-955-3	grafit C	7782-42-5
232-273-9	solsikkeolie Ekstrakter og deres fysisk modificerede derivater. De består primært af glycerider af fedtsyrerne linolsyre og oliesyre *(Helianthus annuus, Compositae*).	8001-21-6
232-274-4	sojaolie Ekstrakter og deres fysisk modificerede derivater. De består primært af glycerider af fedtsyrerne linolsyre, palmitinsyre og stearinsyre (*Soja hispida, Leguminosae*).	8001-22-7
232-276-5	farvetidselolie Ekstrakter og deres fysisk modificerede derivater. De består primært af glycerider af fedtsyren linolsyre (*Carthamus tinctorius, Compositae*).	8001-23-8
232-278-6	linolie Ekstrakter og deres fysisk modificerede derivater. De består primært af glycerider af fedtsyrerne linolsyre, linolensyre og oliesyre (*Linum usitatissimum, Linaceae*).	8001-26-1
232-281-2	majsolie Ekstrakter og deres fysisk modificerede derivater. De består primært af glycerider af fedtsyrerne linolsyre, oliesyre, palmitinsyre og stearinsyre *(Zea mays, Gramineae).*	8001-30-7
232-293-8	ricinusolie Ekstrakter og deres fysisk modificerede derivater. De består primært af glycerider af fedtsyren ricinusoliesyre *(Ricinus communis, Euphorbiaceae).*	8001-79-4
232-299-0	rapsolie	8002-13-9

EINECS-nr.	Navn/gruppe	CAS-nr.
	Ekstrakter og deres fysisk modificerede derivater. De består primært af glycerider af fedtsyrerne erucasyre, linolsyre og oliesyre *(Brassica napus, Cruciferae).*	
232-307-2	lecithiner Den sammensatte blanding af diglycerider af fedtsyrer bundet til cholinesteren af phosphorsyre.	8002-43-5
232-436-4	sirupper, hydrolyserede stivelses- En sammensat blanding opnået ved hydrolyse af majsstivelse ved indvirkning af syrer eller enzymer. Den består primært af D-glucose, maltose og maltodextriner.	8029-43-4
232-442-7	talg, hydrogeneret	8030-12-4
232-675-4	dextrin	9004-53-9
232-679-6	stivelse Højpolymert kulhydrat, sædvanligvis udvundet fra kornkerner, såsom majs, hvede og durra og fra rødder og knolde, såsom kartofler og tapioka. Indbefatter stivelse, der er prægelatineret ved opvarmning i tilstedeværelse af vand.	9005-25-8
232-940-4	Maltodextrin	9050-36-6
234-328-2	vitamin A	11103-57-4
238-976-7	natrium-D-gluconat $C_6H_{12}O_7.xNa$	14906-97-9
248-027-9	D-glucitolmonostearat $C_{24}H_{48}O_7$	26836-47-5
262-988-1	fedtsyrer, kokos-, methylestere	61788-59-8
262-989-7	fedtsyrer, talg-, methylestere	61788-61-2
263-060-9	fedtsyrer, ricinusolie-	61789-44-4
263-129-3	fedtsyrer, talg-	61790-37-2
266-925-9	fedtsyrer, C_{12-18}- Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{12}-C_{18} alkyl carboxylic acid* og SDA Reporting Number: 16-005-00.	67701-01-3
266-928-5	fedtsyrer, C_{16-18}- Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{16}-C_{18} alkyl carboxylic acid* og SDA	67701-03-5

EINECS-nr.	Navn/gruppe	CAS-nr.
	Reporting Number: 19-005-00.	
266-929-0	fedtsyrer, C_{8-18}- og C_{18}-umættede Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_8-C_{18} and C_{18} unsaturated alkyl carboxylic acid* og SDA Reporting Number: 01-005-00.	67701-05-7
266-930-6	fedtsyrer, C_{14-18}- og C_{16-18}-umættede Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{14}-C_{18} and C_{16}-C_{18} unsaturated alkyl carboxylic acid* og SDA Reporting Number: 04-005-00	67701-06-8
266-932-7	fedtsyrer, C_{16}-C_{18}- $_{og}$ C_{18}-umættede Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{16}-C_{18} and C_{18} unsaturated alkyl carboxylic acid* og SDA Reporting Number: 11-005-00	67701-08-0
266-948-4	glycerider, C_{16-18} -og C_{18}-umættede Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{16}-C_{18} and C_{18} unsaturated trialkyl glyceride* og SDA Reporting Number: 11-001-00.	67701-30-8
267-007-0	fedtsyrer C_{14-18}- og C_{16-18}-umættede, methylestere Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{14}-C_{18} and C_{16}-C_{18} unsaturated alkyl carboxylic acid methyl ester* og SDA Reporting Number: 04-010-00.	67762-26-9
267-013-3	fedtsyrer, C_{6-12}- Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_6-C_{12} alkyl carboxylic acid* og SDA Reporting Number: 13-005-00.	67762-36-1
268-099-5	fedtsyrer, C_{14-22}- og C_{16-22} umættede Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{14}-C_{22}* and *C_{16}-C_{22} unsaturated alkyl carboxylic acid* og SDA Reporting Number: 07-005-00	68002-85-7
268-616-4	sirupper, majs-, dehydrerede	68131-37-3
269-657-0	fedtsyrer, soja	68308-53-2
269-658-6	glycerider, talg-, mono-, di- og tri-, hydrogenerede	68308-54-3
270-298-7	fedtsyrer, C_{14-22}-	68424-37-3
270-304-8	fedtsyrer, linolie-	68424-45-3

EINECS-nr.	Navn/gruppe	CAS-nr.
270-312-1	glycerider, C_{16-18}- og C_{18}-umættede mono- og di- Denne forbindelse identificeres ved SDA Substance Name: *C_{16}-C_{18} and C_{18} unsaturated alkyl and C_{16}-C_{18} and C_{18} unsaturated dialkyl glyceride* og SDA Reporting Number: 11-002-00.	68424-61-3
288-123-8	glycerider, C_{10-18}-	85665-33-4
292-771-7	fedtsyrer, C_{12-14}-	90990-10-6
292-776-4	fedtsyrer, C_{12-18}- og C_{18}-umættede	90990-15-1
296-916-5	fedtsyrer, rapsolie-, med lavt indhold af erucasyre	93165-31-2

BILAG III

UNDTAGELSER FRA REGISTRERINGSPLIGTEN EFTER ARTIKEL 4, STK. 2, LITRA b)

1. Stoffer, der er blevet radioaktive ved naturlig eller kunstig kerneomdannelse.

2. Stoffer, der dannes ved en kemisk reaktion som følge af, at et andet stof eller en genstand udsættes for miljøfaktorer såsom luft, fugt, mikroorganismer eller sollys.

3. Stoffer, der dannes ved en kemisk reaktion som følge af opbevaring af et andet stof, et præparat eller en genstand.

4. Stoffer, som dannes ved en kemisk reaktion under slutanvendelse af andre stoffer, præparater eller genstande, og som ikke bliver fremstillet, importeret eller markedsført i sig selv.

5. Stoffer, der dannes ved en kemisk reaktion:

   (i) når en stabilisator, et farvestof, et aromastof, en antioxidant, et fyldstof, et opløsningsmiddel, et bærestof, et tensid, en blødgører, et antikorrosionsmiddel, et antiskummiddel, et dispergeringsmiddel, en bundfaldshæmmer, et tørremiddel, et bindemiddel, en emulgator, et anti-emulgerende middel, et afvandingsmiddel, et agglomereringsmiddel, en vedhæftningsforbedrer, en flow modifier, et pH-neutraliserende middel, en kompleksbinder, et koaguleringsmiddel, et flokkuleringsmiddel, et brandhæmmende middel, et smøremiddel, et chelateringsmiddel eller et kvalitetsmodificerende reagens fungerer som tilsigtet, eller

   (ii) når et stof, som alene er bestemt til at frembringe en bestemt fysisk-kemisk egenskab, fungerer som tilsigtet.

6. Biprodukter, medmindre de bliver importeret eller markedsført i sig selv.

7. Hydrater af et stof eller hydrerede ioner, der dannes ved binding af et stof til vand, forudsat at stoffet er registreret af en producent eller importør under påberåbelse af denne undtagelsesbestemmelse.

8. Mineraler, malme eller stoffer, der forekommer i naturen, hvis de ikke modificeres kemisk under fremstillingen, medmindre de opfylder kriterierne for klassificering som farlige efter direktiv 67/548.

9. Naturgas, råolie, kul.

BILAG IV

OPLYSNINGSKRAV OMHANDLET I ARTIKEL 9

VEJLEDENDE BEMÆRKNINGER OM OPFYLDELSE AF KRAVENE I BILAG IV TIL IX

I bilag IV-IX specificeres det, hvilke oplysninger der skal forelægges med henblik på registrering og vurdering efter artikel 9, 11, 12, 39, 40 og 44. For den laveste mængde gælder standardkravene i bilag V, og for hvert efterfølgende mængdeniveau udvides kravene som anført i det tilsvarende bilag. De nøjagtige krav ved de enkelte registreringer er forskellige, alt efter mængde, anvendelse og eksponering. Bilagene skal således betragtes som en helhed og i sammenhæng med overordnede krav om registrering, vurdering og diligenspligt.

TRIN 1 – INDSAMLING OG DELING AF FORELIGGENDE OPLYSNINGER

Registranten skal indsamle alle foreliggende testdata for det stof, der skal registreres. Registreringsansøgninger skal så vidt muligt indgives af konsortier i henhold til artikel 10 eller 17. Derved kan testdata deles, så unødvendige test undgås og omkostningerne mindskes. Registranten skal desuden indsamle alle andre foreliggende oplysninger om stoffet. Disse bør omfatte alternative data (f.eks. fra (Q)SAR, analogisering fra andre stoffer, in vitro-undersøgelser, epidemiologiske data), som kan medvirke til at fastslå, om stoffet har farlige egenskaber eller ikke, og som i visse tilfælde kan erstatte resultaterne af dyreforsøg. Derudover indsamles der oplysninger om eksponering, anvendelse og risikostyringsforanstaltninger i henhold til artikel 9 og bilag V. Ved at behandle alle disse oplysninger under ét vil registranten kunne fastslå, om der er behov for at generere yderligere oplysninger.

TRIN 2 – VURDERING AF BEHOVET FOR OPLYSNINGER

Registranten skal fastlægge, hvilke oplysninger der er nødvendige til registreringen. Først fastslås det, hvilket eller hvilke relevante bilag der skal overholdes i henhold til mængden. I bilagene specificeres det, hvilke standardoplysninger der er obligatoriske, men der skal også tages højde for bilag IX, som giver mulighed for afvigelse fra standardmetoden, når det kan begrundes. På dette stadium skal især oplysningerne om eksponering, anvendelse og risikostyringsforanstaltninger lægges til grund for vurderingen af informationsbehovet for stoffet.

TRIN 3 – AFDÆKNING AF MANGLER I OPLYSNINGERNE

Registranten sammenholder derefter informationsbehovet for stoffet med de foreliggende oplysninger og konstaterer, hvor der er mangler. Det er vigtigt, at man på dette stadium skaffer sikkerhed for, at de foreliggende oplysninger er relevante og fyldestgørende i forhold til kravene.

TRIN 4 – GENERERING AF NYE OPLYSNINGER/FORSLAG TIL TESTSTRATEGI

I nogle tilfælde er der ikke brug for at generere nye oplysninger. Men når der er behov for at udfylde mangler i oplysningerne, skal der genereres nye oplysninger (bilag V og VI) eller

foreslås en teststrategi (bilag VII og VIII), afhængigt af mængden. Nye test i hvirveldyr må kun foretages eller foreslås som en sidste udvej, når alle øvrige datakilder er udtømt.

I nogle tilfælde kan reglerne i bilag V-IX gøre det nødvendigt at udføre visse tests tidligere end angivet i standardkravene eller ud over, hvad standardkravene foreskriver.

BEMÆRKNINGER

Bemærkning 1: Hvis det ikke er teknisk muligt at give de pågældende oplysninger, eller der ikke fagligt belæg for, at de skal gives, skal dette tydeligt begrundes i overensstemmelse med de pågældende bestemmelser.

Bemærkning 2: Registranten kan ønske at erklære, at visse oplysninger i registreringsdokumentationen er fortrolige. I så fald skal han angive en liste over de pågældende punkter og give en begrundelse i henhold til artikel 115.

OPLYSNINGER SOM OMHANDLET I ARTIKEL 9, STK. 1, LITRA A), NR. i)-v)

1. ALMINDELIGE OPLYSNINGER OM REGISTRANTEN

1.1. Registrant

1.1.1. Navn, adresse, telefonnummer, faxnummer og e-mail

1.1.2. Kontaktperson

1.1.3. Adresse på de anlæg, hvor registrantens produktion og egen anvendelse finder sted (hvis relevant)

1.2. Fælles indsendelse af oplysninger fra konsortier: andre medlemmer af konsortiet

Artikel 10 eller 17 giver mulighed for, at dele af registreringen kan indsendes af én producent eller importør på vegne af de øvrige medlemmer af konsortiet.

I så fald skal den pågældende producent eller importør anføre de øvrige konsortium-medlemmers:

– navn, adresse, telefonnummer, faxnummer og e-mail

– de dele af den aktuelle registrering, som finder anvendelse på andre medlemmer af konsortiet.

  Nummeret (numrene) i henholdsvis bilag IV, V, VI, VII eller VIII angives.

Alle de øvrige medlemmer af konsortiet anfører for den producent/importør, på hvis vegne de ansøger:

– navn, adresse, telefonnummer, faxnummer og e-mail

– de dele af registreringen, som indsendes af de(n) pågældende producent(er) eller importør(er).

  Nummeret (numrene) i henholdsvis bilag IV, V, VI, VII eller VIII angives.

2. IDENTIFIKATION AF STOFFET

For hvert stof skal oplysningerne i dette afsnit være tilstrækkelige til, at stoffet kan identificeres. Hvis det for et eller flere af nedenstående punkter ikke er teknisk muligt eller der ikke synes at være fagligt belæg for at give oplysninger, skal dette tydeligt begrundes.

2.1. Navn på hvert stof eller anden identifikation

2.1.1. Navn(e) i IUPAC-nomenklatur eller andet (andre) internationalt (internationale) (kemisk(e) navn(e)

2.1.2. Andre navne (trivialnavn, handelsbetegnelse, forkortelse)

2.1.3. EINECS eller ELINCS-nummer (hvis det foreligger og det er hensigtsmæssigt)

2.1.4. CAS-navn og CAS-nummer (hvis de foreligger)

2.1.5. Anden identitetskode (hvis den foreligger)

2.2. Oplysninger vedrørende molekyl- og strukturformel for hvert stof

2.2.1 Molekyl- og strukturformel (herunder SMILES-notation, hvis den foreligger)

2.2.2 Oplysninger om optisk aktivitet (hvis det er relevant og hensigtsmæssigt)

2.2.3. Molekylvægt eller molekylvægtområde

2.3. Sammensætning af hvert stof

2.3.1. Renhedsgrad (%)

2.3.2. Urenheders art, herunder isomerer og biprodukter

2.3.3. Procentdel af de vigtigste (betydelige) urenheder

2.3.4. Art og størrelsesorden (.....ppm, ...%) af eventuelle tilsætningsstoffer (f.eks. stabilisatorer eller inhibitorer)

2.3.5. Spektroskopidata (UV, IR, NMR eller MS)

2.3.6. Højtryksvæskekromatogram, gaskromatogram

2.3.7. Beskrivelse af analysemetoder eller pågældende bibliografiske henvisninger vedrørende identifikation af stoffet og eventuelle urenheder og tilsætningsstoffer. Disse oplysninger skal være tilstrækkelige til, at metoderne kan reproduceres.

3. OPLYSNINGER OM STOFFETS (STOFFERNES) ANVENDELSE(R)

3.1. Samlet produktion og/eller import i tons for hver producent eller importør pr. år i:

3.1.1. Det kalenderår, hvor registrering finder sted (anslået mængde)

3.2. For producenter, kortfattet beskrivelse af den tekniske proces, der anvendes ved fremstillingen

Der kræves ikke nøje detaljer om processen, navnlig ikke når de er kommercielt følsomme.

3.3. Angivelse af den mængde, der går til egen (egne) anvendelse(r)

3.4. Form (stof, præparat eller genstand) og/eller den fysiske tilstand, hvori stoffet stilles til rådighed for downstream-brugere. Koncentration eller koncentrationsinterval af stoffet i præparater, der stilles til rådighed for downstream-brugere, og mængde af stoffet i genstande, der stilles til rådighed for downstream-brugere.

3.5. Kortfattet generel beskrivelse af de(n) udpegede anvendelse(r)

3.6. Mængde og sammensætning af affald fra produktionen og de udpegede anvendelser (når de kendes).

3.7. Anvendelser, som frarådes (jf. sikkerhedsdatabladets punkt 16)

Angivelse af eventuelle anvendelser, som registranten fraråder, og hvorfor (dvs. ikke lovpligtige anbefalinger fra leverandøren). Denne liste behøver ikke være udtømmende.

4. KLASSIFICERING OG MÆRKNING

4.1. Stoffets (stoffernes) fareklassificering i henhold til artikel 4 og 6 i direktiv 67/548/EØF

Desuden angives for hvert stof en begrundelse for, at der ikke er angivet en klassificering i henhold til en bestemt egenskab (dvs. fordi data ikke foreligger, ikke er entydige eller er entydige, men utilstrækkelige til klassificering).

4.2. Den faremærkning for stoffet (stofferne), man når frem til ved anvendelse af artikel 23-25 i direktiv 67/548/EØF

4.3. Eventuelle særlige koncentrationsgrænser, der fastlægges ved anvendelse af artikel 4, stk. 4, i direktiv 67/548/EØF og artikel 4-7 i direktiv 1999/45/EF.

5. VEJLEDNING I SIKKER ANVENDELSE VEDRØRENDE:

Disse oplysninger skal være i overensstemmelse med oplysningerne i sikkerhedsdatabladet, når et sådant kræves i henhold til artikel 29.

5.1. Førstehjælpsforanstaltninger (sikkerhedsdatablad punkt 4)

5.2. Brandbekæmpelse (sikkerhedsdatablad punkt 5)

5.3. Forholdsregler ved udslip (sikkerhedsdatablad punkt 6)

5.4. Håndtering og opbevaring (sikkerhedsdatablad punkt 7)

5.5. Transportoplysninger (sikkerhedsdatablad punkt 14)

Når der ikke kræves en kemisk sikkerhedsrapport, skal der gives følgende supplerende oplysninger.

5.6. Eksponeringskontrol/personlige værnemidler (sikkerhedsdatablad punkt 8)

5.7. Stabilitet og reaktivitet (sikkerhedsdatablad punkt 10)

5.8. Bortskaffelse

5.8.1. Bortskaffelse (sikkerhedsdatablad punkt 13)

5.8.2. Oplysninger om genanvendelse og bortskaffelsesmetoder for industri

5.8.3 Oplysninger om genanvendelse og bortskaffelsesmetoder for publikum

BILAG V

OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 1 TON ELLER DEROVER

I kolonne 1 i dette bilag angives, hvilke standardoplysninger der er obligatoriske for alle stoffer, som produceres eller importeres i en mængde på 1 ton eller derover, jf. artikel 11, stk. 1, litra a). Kolonne 2 i dette bilag indeholder de nærmere regler for, hvilke obligatoriske standardoplysninger der kan udelades, erstattes af andre oplysninger, forelægges på et andet stadium eller tilpasses på anden måde. Hvis forudsætningerne i kolonne 2 i dette bilag for at foretage tilpasninger er opfyldt, skal registranten tydeligt erklære dette og angive begrundelse for hver tilpasning i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen.

Ud over disse særlige regler gælder det, at en registrant kan tilpasse de obligatoriske standardoplysninger i kolonne 1 i dette bilag efter de generelle regler i bilag IX. Også i dette tilfælde skal registranten tydeligt angive begrundelse for hver tilpasning, han har foretaget i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen med henvisning til de pågældende særlige regler i kolonne 2 eller i bilag IX eller X[7].

Før der foretages nye tests til bestemmelse af de i dette bilag opregnede egenskaber, vurderes alle foreliggende *in vitro*-data, *in vivo*-data, historiske data, data fra gyldige (Q)SARer og data fra strukturelt beslægtede stoffer (analogisering).

Hvis der for bestemte egenskabers vedkommende ikke gives oplysninger af andre grunde end de i kolonne 2 i dette bilag eller i bilag IX nævnte, skal dette angives tydeligt, og klar begrundelse herfor ligeledes gives.

[7] Bemærkning: de betingelser for undladelse af en bestemt test, der er fastlagt i de pågældende testmetoder i selve bilag X, men ikke gentaget i kolonne 2, finder ligeledes anvendelse.

5. OPLYSNINGER OM STOFFETS FYSISK-KEMISKE EGENSKABER

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
5.1. Stoffets tilstandsform ved 20°C og 101,3 kPa	
5.2. Smelte-/frysepunkt	5.2. Undersøgelsen behøver ikke udføres for faste stoffer og væsker med smelte-/frysepunkt under 0°C.
5.3. Kogepunkt	5.3. Undersøgelsen behøver ikke udføres: – for gasser – for faste stoffer, som enten har højere smeltepunkt end 360°C eller dekomponerer før de koger; i sådanne tilfælde kan et kogepunkt ved reduceret tryk skønnes eller måles – for stoffer, som dekomponerer før kogning (f.eks. ved auto-oxidation, omlejring, nedbrydning, dekomponering osv.).
5.4. Relativ massefylde	5.4. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet kun er stabilt ved opløsning i et bestemt opløsningsmiddel, og opløsningens vægtfylde er omtrent som opløsningsmidlets; i så fald er det tilstrækkeligt at angive, om opløsningens vægtfylde er højere eller lavere end opløsningsmidlets – stoffet er en gas; i dette tilfælde foretages en skønsmæssig beregning ud fra stoffets molekylvægt og idealgasloven.
5.5. Damptryk	5.5. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – der iagttages en omdannelse (ændring af fysisk tilstandsform eller dekomponering); følgende oplysninger skal da medtages: omdannelsens art, den temperatur, ved hvilken omdannelsen finder sted ved atmosfæretryk, damptryk ved 10 og 20°C over denne temperatur (medmindre

	omdannelsen er fra fast stof til gas) – smeltepunktet er over 300°C. Er smeltepunktet mellem 200°C og 300°C, er en grænseværdi, baseret på måling eller en anerkendt beregningsmetode, tilstrækkelig.
5.6. Overfladespænding	5.6. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: - vandopløseligheden er under 1 mg/l ved 20°C. - stoffet danner miceller i det pågældende koncentrationsområde.
5.7. Vandopløselighed	5.7. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er ustabilt pga. hydrolyse (halveringstid under 12 timer) – stoffet er let oxiderbart i vand. Fremtræder stoffet "uopløseligt" i vand, udføres en grænsetest ned til analysemetodens påvisningsgrænse.
5.8. Fordelingskoefficient: n-oktanol/vand	5.9. Undersøgelsen behøver ikke udføres for uorganiske stoffer, Hvis testen ikke kan udføres (f.eks. fordi stoffet nedbrydes, har høj overfladeaktivitet, reagerer voldsomt under udførelse af testen eller ikke kan opløses i vand eller oktanol, eller der ikke kan skaffes tilstrækkelig rent stof), angives en beregnet log P-værdi samt beskrivelse af beregningsmåden.
5.9. Flammepunkt	5.10. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er uorganisk – stoffet kun indeholder flygtige organiske komponenter med flammepunkt over 100°C for vandige opløsninger

	– det skønnede flammepunkt er over 200°C – flammepunktet kan forudsiges nøjagtigt ved interpolation fra eksisterende karakteriserede materialer.
5.10. Antændelighed	5.11. Undersøgelsen behøver ikke udføres: – hvis der er tale om et fast stof, som er eksplosivt eller pyrofort; disse egenskaber skal altid tages i betragtning, før antændeligheden vurderes – for gasser, hvis koncentrationen af den brændbare gas i blanding med inaktive gasser er så lav, at koncentrationen af gassen ved opblanding med luft til stadighed vil være under den nedre grænse – for stoffer, der antændes spontant ved kontakt med luft.
5.11. Eksplosive egenskaber	5.12. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – molekylet ikke indeholder kemiske grupper, som er knyttet til eksplosionsfarlige egenskaber – stoffet indeholder kemiske grupper, som er knyttet til eksplosionsfarlige egenskaber og indeholder oxygen, og den beregnede oxygenbalance er under –200 – det organiske stof er en homogen blanding af organiske stoffer, som indeholder kemiske grupper, som er knyttet til eksplosionsfarlige egenskaber, men den eksoterme dekomponeringsenergi er under 500 J/g, og eksoterm dekomponering sætter ind ved temperaturer under 500ºC – for blandinger af uorganiske oxiderende stoffer (FN-klasse 5.1) med organiske stoffer, koncentrationen af det uorganiske oxiderende stof er: – under 15 % (w/w), hvis den henhører under FN-emballagegruppe I (høj risiko) eller II (mellemhøj risiko) – under 30 % (w/w), hvis den henhører under FN-emballagegruppe III (lav risiko).

	Bemærkning: Hvis den eksoterme dekomponeringsenergi for organiske stoffer er under 800 J/g, kræves hverken test for forplantning af detonation eller test for følsomhed for detonationschok.
5.12. Selvantændelsestemperatur	5.13. Undersøgelsen behøver ikke udføres: – hvis stoffet er eksplosivt eller spontant bryder i brand ved kontakt med luft ved rumtemperatur – for væsker, der er ubrændbare i luft, f.eks. intet flammepunkt op til 200°C – for gasser uden antændelsesområde – for faste stoffer, hvis de har smeltepunkt < 160°C, eller hvis de foreløbige resultater udelukker selvopvarmning af stoffet op til 400°C.
5.13. Oxiderende egenskaber	5.14. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er eksplosivt – stoffet er meget brandfarligt – stoffet er et organisk peroxid – stoffet er ude af stand til at reagere eksotermt med brændbare materialer, f.eks. ud fra dets kemiske struktur (som f.eks. organiske stoffer, der ikke indeholder oxygen- eller halogenatomer, eller hvori disse grundstoffer ikke er kemisk bundet til nitrogen eller oxygen, samt uorganiske stoffer, der ikke indeholder oxygen- eller halogenatomer). For faste stoffer gælder, at hvis en indledende prøve klart viser, at stoffet har oxiderende egenskaber, behøver hele undersøgelsen ikke udføres. Bemærk, at der ikke findes nogen testmetode til bestemmelse af gasformige blandingers oxiderende egenskaber; vurdering af disse egenskaber må foretages ved et skøn ud fra en sammenligning af gassens oxidationspotentiale i en blanding med oxygens oxidationspotentiale i luft.

5.14. Kornstørrelsesfordeling	5.15. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis stoffet markedsføres eller anvendes i ikke-fast form eller partikelform.

6. TOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

In vivo-undersøgelse af ætsende stoffer ved koncentrationer, der medfører ætsning, skal undgås.

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
6.1. Hudirritation eller hudætsning Denne egenskab vurderes i nedenstående trin i den anførte rækkefølge: (1) vurdering af de data, der foreligger for mennesker og dyr (2) vurdering af sur eller basisk reaktion (3) *in vitro*-undersøgelse for hudætsning (4) *in vitro*-undersøgelse for hudirritation.	6.1. Trin 3 og 4 behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er ætsende – stoffet er stærkt surt (pH < 2,0) eller basisk (pH > 11,5) – stoffet er brændbart i luft ved rumtemperatur – stoffet er meget giftigt ved kontakt med huden – undersøgelsen af akut dermal toksicitet ikke viser hudirritation op til grænsedosis (2000 mg/kg legemsvægt).
6.2. Øjenirritation Denne egenskab vurderes i nedenstående trin i den anførte rækkefølge: (1) vurdering af de data, der foreligger for mennesker og dyr (2) evaluering af sur eller basisk reaktion (3) *in vitro*-undersøgelse for øjenirritation.	6.2. Trin 3 behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er ætsende – stoffet er stærkt surt (pH < 2,0) eller basisk (pH > 11,5) – stoffet er brændbart i luft ved rumtemperatur – stoffet er klassificeret som irriterende ved kontakt med huden, og forudsat at registranten klassificerer stoffet som øjenirriterende.

6.3. Hudsensibilisering Denne egenskab vurderes i nedenstående trin i den anførte rækkefølge: (1) vurdering af de data, der foreligger for mennesker og dyr (2) Assay i lokale lymfeknuder i mus (LLNA).	6.3. Trin 2 behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er ætsende, meget toksisk eller irriterende ved kontakt med huden – stoffet er stærkt surt (pH < 2,0) eller basisk (pH > 11,5) – stoffet er brændbart i luft ved rumtemperatur. Hvis stoffet kan klassificeres efter hudsensibilisering på grundlag af resultaterne af det første trin, kan de følgende trin udelades, og registranten klassificerer stoffet som hudsensibiliserende. Hvis LLNA ikke er tilstrækkelig til undersøgelse af det pågældende stof, kan maksimeringstest i marsvin (GPMT) anvendes.
6.4. Mutagenicitet **6.4.1. *In vitro*-genmutationsundersøgelse i bakterier**	6.4. Er resultatet positivt, skal yderligere mutagenicitetsundersøgelser overvejes.

7. ØKOTOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
7.1. Giftighed for vandmiljøet	
7.1.1. Korttidstoksicitetstest i *Daphnia*	7.1.1. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis:
Registranten kan foretrække langtidstoksicitetstest frem for korttidstest.	– stoffet er meget tungtopløseligt (vandopløselighed < 10 μg/l) – stoffet ikke forventes at ville trænge gennem biologiske membraner (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å) – der foreligger en langtidstoksicitetsundersøgelse. **Langtidsundersøgelsen for akvatisk toksicitet i *Daphnia*** (bilag VII, 7.1.5) skal udføres, hvis sammenholdelse af den (forventede) miljømæssige eksponering med resultaterne af korttidsdata for akvatisk toksicitet viser behov for yderligere undersøgelse af virkningerne på akvatiske organismer; **Langtidsundersøgelsen for akvatisk toksicitet i *Daphnia*** (bilag VII, 7.1.5) skal overvejes, hvis stoffet har ringe opløselighed i vand (< 1 mg/l).

8. ANDRE FORELIGGENDE FYSISK-KEMISKE, TOKSIKOLOGISKE OG ØKOTOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

Andre relevante fysisk-kemiske, toksikologiske og økotoksikologiske oplysninger skal gives, hvis de foreligger.

BILAG VI

SUPPLERENDE OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 10 TONS ELLER DEROVER

I kolonne 1 i dette bilag angives, hvilke standardoplysninger der er obligatoriske for alle stoffer, som produceres eller importeres i en mængde på 10 ton eller derover, jf. artikel 11, stk. 1, litra b). Oplysningerne i kolonne 1 i dette bilag kræves derfor ud over dem, der kræves i kolonne 1 i bilag V. Kolonne 2 i dette bilag indeholder de nærmere regler for, hvilke obligatoriske standardoplysninger der kan udelades, erstattes af andre oplysninger, forelægges på et andet stadium eller tilpasses på anden måde. Hvis forudsætningerne i kolonne 2 i dette bilag for at foretage tilpasninger er opfyldt, skal registranten tydeligt erklære dette og angive begrundelse for hver tilpasning i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen.

Ud over disse særlige regler gælder det, at en registrant kan tilpasse de obligatoriske standardoplysninger i kolonne 1 i dette bilag efter de generelle regler i bilag IX. Også i dette tilfælde skal registranten tydeligt angive begrundelse for hver tilpasning, han har foretaget i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen med henvisning til de pågældende særlige regler i kolonne 2 eller i bilag IX eller X[8].

Før der foretages nye tests til bestemmelse af de i dette bilag opregnede egenskaber, vurderes alle foreliggende *in vitro*-data, *in vivo*-data, historiske data, data fra gyldige (Q)SARer og data fra strukturelt beslægtede stoffer (analogisering).

Hvis der for bestemte egenskabers vedkommende ikke gives oplysninger af andre grunde end de i kolonne 2 i dette bilag eller i bilag IX nævnte, skal dette angives tydeligt, og klar begrundelse herfor ligeledes gives.

---

8 Bemærkning: de betingelser for undladelse af en bestemt test, der er fastlagt i de pågældende testmetoder i selve bilag X, men ikke gentaget i kolonne 2, finder ligeledes anvendelse.

6. TOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

In vivo-undersøgelse af ætsende stoffer ved koncentrationer, der medfører ætsning, skal undgås.

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
6.1. Hudirritation	
6.1.1. *In vivo*-hudirritation	6.1.1. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er ætsende – stoffet er stærkt surt (pH < 2,0) eller basisk (pH > 11,5) – stoffet er brændbart i luft ved rumtemperatur – stoffet er meget giftigt ved kontakt med huden – undersøgelsen af akut dermal toksicitet ikke viser hudirritation op til grænsedosis (2000 mg/kg legemsvægt) – de data, som foreligger fra det i bilag V, punkt 6.1, foreskrevne undersøgelsesprogram, er tilstrækkelige til at klassificere stoffet som hudætsende eller hudirriterende.
6.2. Øjenirritation	

6.2.1. *In vivo*-øjenirritation	6.2.1. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er ætsende – stoffet er stærkt surt (pH < 2,0) eller basisk (pH > 11,5) – stoffet er brændbart i luft ved rumtemperatur – stoffet er klassificeret som irriterende ved kontakt med huden, og forudsat at registranten klassificerer stoffet som øjenirriterende – de data, som foreligger fra det i bilag V, punkt 6.2, foreskrevne undersøgelsesprogram, er tilstrækkelige til at klassificere stoffet som øjenirriterende.
6.4. Mutagenicitet **6.4.2. *In vitro*-cytogenicitetsundersøgelse i pattedyrceller** **6.4.3. *In vitro*-genmutationsundersøgelse i pattedyrceller**, hvis resultatet er negativt i bilag V, punkt 6.4.1. og bilag VI, 6.4.2.	6.4.2. Undersøgelsen behøver ikke udføres: - hvis der foreligger tilstrækkelige data fra en *in vivo* cytogenicitetstest, eller - stoffet vides at være et carcinogen af kategori 1 eller 2. 6.4.3. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis der foreligger tilstrækkelige data fra en pålidelig *in vivo*-genmutationsundersøgelse i pattedyr. 6.4. Hvis blot én af mutagenicitetsundersøgelserne i bilag V eller VI giver positivt resultat, må *in vivo* **mutagenicitets**undersøgelser overvejes.
6.5. Akut toksicitet For gasser og flygtige væsker (damptryk over 10^{-2} Pa ved 20°C) skal der gives oplysninger vedrørende inhalationsvejen (6.5.2).	6.5. Undersøgelsen (undersøgelserne) behøver ikke udføres, hvis: – stoffet ikke kan indgives i nøjagtige doser på grund af sine fysiske egenskaber – stoffet er ætsende

	– stoffet er brændbart i luft ved rumtemperatur.
For andre stoffer end gasser skal oplysningerne under punkt 6.5.1.-6.5.3. gives for mindst to indgiftsveje, af hvilke den ene skal være oral. Valget af den anden indgiftsvej afhænger af stoffets art og den forventede eksponeringsvej for mennesker. Er der kun én eksponeringsvej, behøves kun oplysninger for denne vej.	Den anden eksponeringsvej vælges på følgende grundlag:
6.5.1. Ad oral vej	
6.5.2. Ved inhalation	*6.5.2. <u>Inhalationstest</u> er <u>hensigtsmæssig</u>, hvis:*
	(1) eksponering af mennesker ved inhalation må forventes at ville finde sted; og
	(2) en af følgende betingelser er opfyldt:
	– stoffets damptryk er over 10^{-2} Pa ved 20°C
	– stoffet er pulverformigt og indeholder over 1 % w/w partikler med en middel aerodynamisk partikeldiameter (MMAD) på under 100 μm
	– stoffet vil blive anvendt på en måde, der frembringer aerosoler, partikler eller dråber i det inhalerbare størrelsesområde (> 1 % w/w partikler med MMAD < 100 μm).
6.5.3. Ad dermal vej	*6.5.3. <u>Dermal test</u> er <u>hensigtsmæssig</u>, hvis:*
	(1) der kan forventes hudkontakt under produktion og/eller anvendelse; og
	(2) de fysisk-kemiske egenskaber viser, at absorption gennem huden har et betydeligt omfang; og
	(3) en af følgende betingelser er opfyldt:
	– der iagttages toksicitet i en undersøgelse af akut oral toksicitet ved lave doser

	– der iagttages systemiske virkninger eller andre tegn på absorption i hud- og/eller øjenirritationsundersøgelser – *in vitro*-undersøgelser tyder på betydelig dermal absorption – der er registreret betydelig akut dermal toksicitet eller dermal penetration for strukturelt beslægtede stoffer. *Dermal test er uhensigtsmæssig, hvis* hudabsorption af stoffet næppe er sandsynlig pga. dets molekylvægt (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å) og lave fedtopløselighed (log Kow under -1 eller over 4).
6.6. Toksicitet ved gentagen dosering **6.6.1. Korttidstoksicitetsundersøgelse med gentagen dosering (28 dage)**, én dyreart, hun- og handyr, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker.	6.6.1. **Korttidstoksicitetsundersøgelsen** (28 dage) behøver ikke udføres, hvis: – der foreligger en pålidelig subkronisk (90 dage) eller kronisk toksicitetsundersøgelse, forudsat at der er anvendt en hensigtsmæssig dyreart og indgiftsvej – stoffet undergår øjeblikkelig spaltning, og der foreligger tilstrækkelige data om spaltningsprodukterne – relevant menneskelig eksponering kan udelukkes. Passende indgiftsvej vælges på følgende grundlag: *Dermal test er hensigtsmæssig, hvis:* (1) der kan forventes hudkontakt under produktion og/eller anvendelse; og (2) de fysisk-kemiske egenskaber viser, at absorption gennem huden har et betydeligt omfang; og (3) en af følgende betingelser er opfyldt: – der iagttages toksicitet i undersøgelsen af akut dermal toksicitet ved lavere doser end i

undersøgelsen af oral toksicitet

– der iagttages systemiske virkninger eller andre tegn på absorption i hud- og/eller øjenirritationsundersøgelser

– *in vitro*-undersøgelser tyder på betydelig dermal absorption

– der er registreret betydelig dermal toksicitet eller dermal penetration for strukturelt beslægtede stoffer.

Dermal test er uhensigtsmæssig, hvis hudabsorption af stoffet næppe er sandsynlig pga. dets molekylvægt (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å) og lave fedtopløselighed (log Kow < -1 eller > 4).

Inhalationstest er hensigtsmæssig, hvis:

(1) eksponering af mennesker ved indånding må forventes at ville finde sted; og

(2) en af følgende betingelser er opfyldt:

– stoffets damptryk er over 10^{-2} Pa ved 20°C

– stoffet er pulverformigt og indeholder over 1 % w/w partikler med en middel aerodynamisk partikeldiameter (MMAD) på under 100 μm

– stoffet vil blive anvendt på en måde, der frembringer aerosoler, partikler eller dråber i det inhalerbare størrelsesområde (> 1 % w/w partikler med MMAD < 100 μm). Er der ingen kontraindikationer, bør orale indgift foretrækkes.

Den **subkroniske toksicitetsundersøgelse** (90 dage) (bilag VII, 6.6.2) skal foreslås af registranten, hvis:

– hyppigheden og varigheden af eksponering af mennesker tilsiger, at en længerevarende undersøgelse er påkrævet, og en af følgende betingelser er opfyldt:

– andre foreliggende data viser, at stoffet kan have en farlig egenskab, der ikke kan afsløres i en

	korttidstoksicitetsundersøgelse – passende udformede toksikokinetiske undersøgelser viser, at stoffet eller dets metabolitter ophobes i bestemte væv eller organer, hvilket muligvis vil være uopdaget i en korttidstoksicitetsundersøgelse, men ved lang tids eksponering må forventes at få negative virkninger . Yderligere undersøgelser skal foreslås af registranten eller kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, hvis: – der ikke kan fastlægges en NOAEL-værdi på grundlag af 28-dages undersøgelsen, medmindre dette skyldes, at der ikke er iagttaget toksiske virkninger – de toksiske virkninger volder særlig betænkelighed (f.eks. alvorlige/svære virkninger) – der er tegn på en virkning, som på grundlag af de foreliggende oplysninger ikke kan karakteriseres fyldestgørende med hensyn til toksikologiske egenskaber og/eller risiko; i sådanne tilfælde kan det også være mere hensigtsmæssigt at udføre særlige toksikologiske undersøgelser, tilrettelagt med henblik på sådanne virkninger (f.eks. immunotoksicitet, neurotoksicitet) – den eksponeringsvej, der er anvendt i den første undersøgelse med gentagen dosering, var uhensigtsmæssig i forhold til den forventede eksponeringsvej for mennesker, og der kan ikke ekstrapoleres mellem de pågældende eksponeringsveje – der er særlige betænkeligheder vedrørende eksponeringen (f.eks. at stoffet anvendelse i forbrugerprodukter fører til et eksponeringsniveau tæt på den dosis, hvor toksisk virkning på mennesker kan forventes) – 28 dages undersøgelsen ikke har vist de samme virkninger som dem, der er påvist i klart strukturelt beslægtede stoffer.
6.7. Reproduktionstoksicitet	6.7. Undersøgelserne behøver ikke udføres, hvis: – stoffet vides at være et genotoksisk carcinogen, og der er indført passende

	risikostyringsforanstaltninger – stoffet vides at være mutagent over for bakterier, og der er indført passende risikostyringsforanstaltninger – relevant menneskelig eksponering kan udelukkes.
6.7.1. Screening for reproduktions- og udviklingstoksicitet, én dyreart (OECD 421), hvis de foreliggende oplysninger om strukturelt beslægtede stoffer, fra (Q)SAR eller fra *in vitro*-metoder ikke giver anledning til at tro, at stoffet kan være udviklingstoksisk.	6.7.1. Et positivt screeningsresultat skal på dette niveau bekræftes med en udviklingstoksicitetsundersøgelse i én dyreart, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker (bilag VI, punkt 6.7.2).
6.7.2. Udviklingstoksicitetsundersøgelse, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker (bilag X B, punkt 31, eller OECD 414).	6.7.2. Undersøgelsen skal indledningsvis udføres i én dyreart. Afgørelsen af, om der skal udføres en undersøgelse i endnu en dyreart, bør baseres på resultatet af den første undersøgelse. **Reproduktionstoksicitetsundersøgelsen i to generationer** (bilag VII, punkt 6.7.3) skal foreslås af registranten, hvis en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering (90 dage) tyder på potentielt reproduktionstoksiske egenskaber (f.eks. histopatologiske påvirkning af gonader), eller hvis stoffet er nært strukturelt beslægtet med et kendt reproduktionstoksisk stof.
6.8 Toksikokinetik **6.8.1. Evaluering af stoffets toksikokinetiske opførsel, i det omfang den kan udledes af de relevante foreliggende oplysninger.**	

7. ØKOTOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
	–
7.1. Giftighed for vandmiljøet	7.1.2. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis:
7.1.2. Undersøgelse af væksthæmmende virkning på alger	– stoffet er meget tungtopløseligt (vandopløselighed < 10 μg/l) – stoffet ikke forventes at ville trænge gennem biologiske membraner (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å).
7.1.3. Korttidstoksicitetsundersøgelse i fisk: Registranten kan foretrække langtidstoksicitetstest frem for korttidstest.	7.1.3. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er meget tungtopløseligt (vandopløselighed < 10 μg/l) – stoffet ikke forventes at ville trænge gennem biologiske membraner (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å) – der foreligger en langtidstoksicitetsundersøgelse. **Langtidsundersøgelsen af akvatisk toksicitet i fisk** (bilag VII, punkt 7.1.6) skal foreslås af registranten eller kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, hvis sammenholdelse af (den forventede) eksponering af miljøet med resultaterne af korttidsdata for akvatisk toksicitet viser behov for yderligere undersøgelse af virkningerne på akvatiske organismer. **Langtidsundersøgelsen for akvatisk toksicitet i fisk** (bilag VII, punkt 7.1.6) skal overvejes, hvis stoffet er tungtopløseligt (vandopløselighed < 1 mg/l).
7.1.4. Testning for hæmning af respiration i aktiveret slam, medmindre der er ringe sandsynlighed for udslip til spildevandsbehandlingsanlæg	7.1.4. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er meget tungtopløseligt (vandopløselighed < 10 μg/l) – stoffet findes at være let bionedbrydeligt, og de anvendte testkoncentrationer ligger i det

	område, der kan forventes i det vand, der kan tilføres til spildevandsbehandlingsanlæg. Undersøgelsen kan erstattes af en nitrifikationshæmningstest, hvis de foreliggende data viser, at stoffet må forventes at hæmme mikroorganismers vækst eller funktioner.
7.2. Nedbrydning **7.2.1. Biotisk** 7.2.1.1. Let bionedbrydelighed **7.2.2. Abiotisk** 7.2.2.1. Hydrolyse som funktion af pH.	7.2. Simuleringsundersøgelserne (bilag VII, 7.2.1.2-7.2.1.4.) skal foreslås af registranten eller kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, hvis den kemiske sikkerhedsvurdering i henhold til bilag I tyder på, at yderligere undersøgelse af stoffets nedbrydning er nødvendig. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af sikkerhedsvurderingen. 7.2.1.1Undersøgelsen behøver ikke udføres for uorganiske stoffer. 7.2.2.1. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er let bionedbrydeligt – vandopløseligheden er under 10 µg/l.
7.3. Skæbne og opførsel i miljøet **7.3.1. Screeningsundersøgelse for adsorption/desorption**	7.3.1. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet ud fra sine fysisk-kemiske egenskaber forventes at have ringe adsorptionspotentiale (f.eks. hvis dets oktanol/vand-fordelingskoefficient er lav) – stoffet nedbrydes hurtigt.

BILAG VII

SUPPLERENDE OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 100 TONS ELLER DEROVER

På det trin, der svarer til dette bilag, skal registranten indsende forslag til og tidsplan for opfyldelse af informationskravene i dette bilag i henhold til artikel 11, stk. 1, litra c).

I kolonne 1 i dette bilag angives, hvilke standardoplysninger der er obligatoriske for alle stoffer, som produceres eller importeres i en mængde på 100 ton eller derover, jf. artikel 11, stk. 1, litra c). Oplysningerne i kolonne 1 i dette bilag kræves derfor ud over dem, der kræves i kolonne 1 i bilag V og VI. Kolonne 2 i dette bilag indeholder de nærmere regler for, hvilke obligatoriske standardoplysninger der kan udelades, erstattes af andre oplysninger, forelægges på et andet stadium eller tilpasses på anden måde. Hvis forudsætningerne i kolonne 2 i dette bilag for at foretage tilpasninger er opfyldt, skal registranten tydeligt erklære dette og angive begrundelse for hver tilpasning i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen.

Ud over disse særlige regler gælder det, at en registrant kan tilpasse de obligatoriske standardoplysninger i kolonne 1 i dette bilag efter de generelle regler i bilag IX. Også i dette tilfælde skal registranten tydeligt angive begrundelse for hver tilpasning, han har foretaget i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen med henvisning til de pågældende særlige regler i kolonne 2 eller i bilag IX eller X[9].

Før der foretages nye tests til bestemmelse af de i dette bilag opregnede egenskaber, vurderes alle foreliggende *in vitro*-data, *in vivo*-data, historiske data, data fra gyldige (Q)SARer og data fra strukturelt beslægtede stoffer (analogisering).

Hvis der for bestemte egenskabers vedkommende ikke gives oplysninger af andre grunde end de i kolonne 2 i dette bilag eller i bilag IX nævnte, skal dette angives tydeligt, og klar begrundelse herfor ligeledes gives.

[9] Bemærkning: de betingelser for undladelse af en bestemt test, der er fastlagt i de pågældende testmetoder i selve bilag X, men ikke gentaget i kolonne 2, finder ligeledes anvendelse.

5. OPLYSNINGER OM STOFFETS FYSISK-KEMISKE EGENSKABER

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
5.18. Stabilitet i organiske opløsningsmidler og identitet af relevante nedbrydningsprodukter Kun obligatorisk, hvis stoffets stabilitet anses for at være kritisk.	5.18. Undersøgelsen behøver ikke udføres for uorganiske stoffer.
5.19. Dissociationskonstant	5.19. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er ustabilt pga. hydrolyse (halveringstid under 12 timer) eller er let oxiderbart i vand – stoffet ikke er opløseligt i vand og ikke indeholder nogen ionstruktur.
5.20. Viskositet	

6. TOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

In vivo-undersøgelse af ætsende stoffer ved koncentrationer, der medfører ætsning, skal undgås.

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
	6.4. Hvis en af **mutagenicitetsundersøgelserne** i bilag V eller VI giver positivt resultat, og der ikke foreligger resultater af en hensigtsmæssig *in vivo*-undersøgelse, skal registranten foreslå en passende *in vivo*-mutagenicitetsundersøgelse. Hvis blot én af de foreliggende *in vivo*-undersøgelser har givet positivt resultat, skal der

	foreslås passende yderligere *in vivo*-undersøgelser.
6.6. Toksicitet ved gentagen dosering **6.6.1. Korttidstoksicitetsundersøgelse med gentagen dosering (28 dage)**, én dyreart, hun- og handyr, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker, medmindre undersøgelsen allerede er forelagt i henhold til kravene i bilag VI, eller der foreslås undersøgelser i henhold til punkt 6.6.2. I så fald finder punkt 3 i bilag IX ikke anvendelse. **6.6.2. Subkronisk toksicitetsundersøgelse (90 dage)**, én dyreart (gnaver), hun- og handyr, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker.	6.6.2. Den subkroniske toksicitetsundersøgelse (90 dage) behøver ikke udføres, hvis: – der foreligger en pålidelig korttidstoksicitetsundersøgelse (28 dage), som viser svære toksiske virkninger efter kriterierne for klassificering af stoffet som R48, og som giver mulighed for, at den observerede NOAEL-28 dage med en passende usikkerhedsfaktor kan ekstrapoleres til NOAEL-90 dage for samme eksponeringsvej – der foreligger en pålidelig kronisk toksicitetsundersøgelse, forudsat at der er anvendt en hensigtsmæssig dyreart og indgiftsvej – stoffet er ureaktivt, uopløseligt eller ikke-inhalerbart, og der ikke er tegn på absorption eller på toksicitet i en 28 dages "grænsetest", navnlig når der i forbindelse med et sådant mønster er tale om begrænset eksponering af mennesker. Passende indgiftsvej vælges på følgende grundlag: *Dermal test er hensigtsmæssig, hvis:* (1) der kan forventes hudkontakt under produktion og/eller anvendelse; og (2) de fysisk-kemiske egenskaber viser, at absorption gennem huden har et betydeligt omfang; og

(3) en af følgende betingelser er opfyldt:

– der iagttages toksicitet i undersøgelsen af akut dermal toksicitet ved lavere doser end i undersøgelsen af oral toksicitet

– der iagttages systemiske virkninger eller andre tegn på absorption i hud- og/eller øjenirritationsundersøgelser

– *in vitr*-undersøgelser tyder på betydelig dermal absorption

– der er registreret betydelig dermal toksicitet eller dermal penetration for strukturelt beslægtede stoffer.

Dermal test er uhensigtsmæssig hvis hudabsorptionen af stoffet næppe er sandsynlig pga. dets molekylvægt (MW > 800) eller molekyldiameter (> 15 Å) og lave fedtopløselighed (log Kow < -1 eller > 4).

Inhalationstest er hensigtsmæssig, hvis:

(1) eksponering af mennesker ved indånding må forventes at ville finde sted; og

(2) en af følgende betingelser er opfyldt:

– stoffets damptryk er over 10^{-2} Pa ved 20°C

– stoffet er pulverformigt og indeholder over 1 % w/w partikler med en middel aerodynamisk partikeldiameter (MMAD) på under 100 μm

– stoffet vil blive anvendt på en måde, der frembringer aerosoler, partikler eller dråber i det inhalerbare størrelsesområde (> 1 % w/w partikler med MMAD < 100 μm). Er der ingen kontraindikationer, bør oral indgift foretrækkes.

Yderligere undersøgelser skal foreslås af registranten eller kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, hvis:

	– der ikke kan fastlægges en NOAEL-værdi på grundlag af 90-dages undersøgelsen, medmindre dette skyldes, at der ikke er iagttaget toksiske virkninger – de toksiske virkninger volder særlig betænkelighed (f.eks. alvorlige/svære virkninger) – der er tegn på en virkning, som på grundlag af de foreliggende oplysninger ikke kan krakteriseres fyldetsgørende med hensyn til toksikologiske egenskaber og/eller risiko; i sådanne tilfælde kan det også være mere hensigtsmæssigt at udføre særlige toksikologiske undersøgelser, tilrettelagt med henblik på sådanne virkninger (f.eks. immunotoksicitet eller neurotoksicitet) – der er særlige betænkeligheder vedrørende eksponeringen (f.eks. at stoffets anvendelse i forbrugerprodukter fører til et eksponeringsniveau tæt på den dosis, hvor toksisk virkning for mennesker kan forventes).
6.7. Reproduktionstoksicitet	6.7. Undersøgelserne behøver ikke udføres, hvis: – stoffet vides at være et genotoksisk carcinogen, og der er indført passende risikostyringsforanstaltninger – stoffet vides at være mutagent over for bakterier, og der er indført passende risikostyringsforanstaltninger.
6.7.2. Udviklingstoksicitetsundersøgelse, én dyreart, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker (bilag X B, punkt 31 eller OECD 414), medmindre sådanne undersøgelser allerede er forelagt efter kravene i bilag VI.	6.7.2 Undersøgelsen skal indledningsvis udføres i én dyreart. Afgørelsen af, om der skal udføres en undersøgelse i endnu en dyreart, bør baseres på resultatet af den første undersøgelse.
6.7.3. Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer, én dyreart, hun- og handyr, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker, hvis 28-dages eller 90-dages undersøgelsen viser negative virkninger på forplantningsorganer eller -væv	

7. ØKOTOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
7.1. Giftighed for vandmiljøet	7.1. Langtidstoksicitetsundersøgelser skal foreslås af registranten, hvis den kemiske sikkerhedsvurdering i henhold til bilag I tyder på, at yderligere undersøgelse af stoffets virkninger på akvatiske organismer er nødvendig. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af sikkerhedsvurderingen.
7.1.5. Langtidstoksicitetsundersøgelse i *Daphnia* (medmindre den allerede er forelagt i henhold til kravene i bilag V)	7.1.5. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet ikke forventes at ville trænge gennem biologiske membraner (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å) – direkte eller indirekte eksponering af det akvatiske delmiljø er usandsynlig.
7.1.6. Langtidstoksicitetsundersøgelse i fisk, medmindre den allerede er forelagt i henhold til kravene i bilag VI)	7.1.6. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet ikke forventes at ville trænge gennem biologiske membraner (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å) – direkte eller indirekte eksponering af det akvatiske delmiljø er usandsynlig.
Der skal gives oplysninger svarende til enten 7.1.6.1, 7.1.6.2 eller 7.1.6.3.	
7.1.6.1 Test af toksicitet over for fisk i det tidlige livsstadium (FELS) (OECD 210)	7.1.6.1. FELS-toksicitetstest skal foreslås af registranten eller kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, hvis stoffet har potentiale for bioakkumulering.
7.1.6.2 Korttidstoksicitetstest i fisk i embryon- og yngelstadiet (bilag X C.15 eller OECD 212)	
7.1.6.3 Fisk, opvækstforsøg, unge fisk (bilag X C.14 eller OECD	

215)	
7.2. Nedbrydning	7.2. Yderligere nedbrydningsforsøg skal foreslås af registranten, hvis den kemiske sikkerhedsvurdering i henhold til bilag I tyder på, at yderligere undersøgelse af stoffets nedbrydning er nødvendig. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af sikkerhedsvurderingen.
7.2.1. Biotisk I nedenstående tilfælde skal de i punkt 7.2.1.3 og 7.2.1.4 nævnte oplysninger desuden foreslås af registranten, eller de kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44.	
7.2.1.2. Simuleringstest af endelig nedbrydning i overfladevand	7.2.1.2. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – vandopløseligheden er under 10 µg/l – stoffet er let bionedbrydeligt.
7.2.1.3. Jordsimuleringstest (for stoffer med stort potentiale for adsorption til jord)	7.2.1.3. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er let bionedbrydeligt – direkte eller indirekte eksponering af jord er usandsynlig.
7.2.1.4. Sedimentsimuleringstest (for stoffer med stort potentiale for adsorption til sediment)	7.2.1.4. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet er let bionedbrydeligt – direkte eller indirekte eksponering af jord er usandsynlig.
7.2.3. Identifikation af nedbrydningsprodukter	7.2.3. medmindre stoffet er let bionedbrydeligt Yderligere forsøg skal foreslås af registranten, hvis den kemiske sikkerhedsvurdering i henhold til bilag I viser, at yderligere undersøgelse af stoffets skæbne og opførsel er

	nødvendig. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af sikkerhedsvurderingen.
7.3. Skæbne og opførsel i miljøet	
7.3.2. Biokoncentration i (én) akvatisk(e) art(er), fortrinsvis fisk	7.3.2. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet har ringe potentiale for bioakkumulering (dvs. log Kow < 3) – stoffet ikke forventes at ville trænge gennem biologiske membraner (MW > 800 eller molekyldiameter > 15 Å) – direkte eller indirekte eksponering af det akvatiske delmiljø er usandsynlig.
7.3.3. Yderligere undersøgelser af adsorption/desorption afhænger af resultaterne af den i bilag VI krævede undersøgelse.	7.3.3. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet ud fra sine fysisk-kemiske egenskaber forventes at have ringe adsorptionspotentiale (f.eks. hvis dets oktanol/vand-fordelingskoefficient er lav), eller – stoffet nedbrydes hurtigt.
7.4. Virkninger på terrestriske organismer	7.4. Disse undersøgelser behøver ikke udføres, hvis direkte eller indirekte eksponering af jordbunden er usandsynlig. I mangel af toksicitetsdata for jordorganismer kan ligevægtsfordelingsmetoden anvendes til vurdering af eksponeringen af jordorganismer. I tilfælde af betydelig eksponering skal et udvalg af følgende undersøgelser foreslås af registranten: Navnlig for stoffer med stort potentiale for absorption til jord skal registranten overveje langtidsundersøgelser i stedet for korttidsundersøgelser af toksicitet.
7.4.1. Korttidstoksicitet i regnorme.	
7.4.2. Virkninger på jordmikroorganismer	

7.4.3. Korttidstoksicitet i planter	

9. PÅVISNINGS- OG ANALYSEMETODER

På anmodning skal gives en beskrivelse af de analysemetoder, der er anvendt til de delmiljøer, som der er udført undersøgelser af. Hvis analysemetoderne ikke foreligger, skal dette begrundes.

BILAG VIII

SUPPLERENDE OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER FOR STOFFER, DER PRODUCERES ELLER IMPORTERES I EN MÆNGDE PÅ 1000 TONS ELLER DEROVER

På det trin, der svarer til dette bilag, skal registranten indsende forslag til og tidsplan for opfyldelse af informationskravene i dette bilag i henhold til artikel 11, stk. 1, litra d).

I kolonne 1 i dette bilag angives, hvilke standardoplysninger der er obligatoriske for alle stoffer, som produceres eller importeres i en mængde på 1000 ton eller derover, jf. artikel 11, stk. 1, litra d). Oplysningerne i kolonne 1 i dette bilag kræves derfor ud over dem, der kræves i kolonne 1 i bilag V, VI og VII. Kolonne 2 i dette bilag indeholder de nærmere regler for, hvilke obligatoriske standardoplysninger der kan udelades, erstattes af andre oplysninger, forelægges på et andet stadium eller tilpasses på anden måde. Hvis forudsætningerne i kolonne 2 i dette bilag for at foretage tilpasninger er opfyldt, skal registranten tydeligt erklære dette og angive begrundelse for hver tilpasning i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen.

Ud over disse særlige regler gælder det, at en registrant kan tilpasse de obligatoriske standardoplysninger i kolonne 1 i dette bilag efter de generelle regler i bilag IX. Også i dette tilfælde skal registranten tydeligt angive begrundelse for hver tilpasning, han har foretaget i de pågældende punkter i registreringsdokumentationen med henvisning til de pågældende særlige regler i kolonne 2 eller i bilag IX eller X[10].

Før der foretages nye tests til bestemmelse af de i dette bilag opregnede egenskaber, vurderes alle foreliggende *in vitro*-data, *in vivo*-data, historiske data, data fra gyldige (Q)SARer og data fra strukturelt beslægtede stoffer (analogisering).

Hvis der for bestemte egenskabers vedkommende ikke gives oplysninger af andre grunde end de i kolonne 2 i dette bilag eller i bilag IX nævnte, skal dette angives tydeligt, og klar begrundelse herfor ligeledes gives.

[10] Bemærkning: de betingelser for undladelse af en bestemt test, der er fastlagt i de pågældende testmetoder i selve bilag X, men ikke gentaget i kolonne 2, finder ligeledes anvendelse.

6. TOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
	6.4. Giver blot én tidligere mutagenicitetsundersøgelse positivt resultat, skal yderligere . **mutagenicitetsundersøgelser** foreslås af registranten. 6.6.3. **En langttidstoksicitetsundersøgelse med gentagen dosering** (≥ 12 måneder) kan foreslås af registranten eller kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, når hyppighed og varighed af eksponeringen af mennesker tilsiger, at en længere undersøgelsesperiode er påkrævet, og en af følgende betingelser er opfyldt: – der er i 28 dages eller 90 dages undersøgelsen iagttaget alvorlige eller svære toksiske virkninger, som giver særlig grund til betænkelighed, og som på grundlag af de foreliggende oplysninger ikke kan karakteriseres fyldestgørende med hensyn til toksikologiske egenskaber eller risiko – de virkninger, der er fundet i stoffer, som er klart strukturelt beslægtede med det undersøgte stof, er ikke påvist i 28 dages undersøgelsen eller 90 dages undersøgelsen – stoffet kan have en farlig egenskab, som ikke kan påvises i en 90 dages undersøgelse.

	6.6. **Yderligere undersøgelser** skal foreslås af registranten eller kan kræves af den kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, såfremt: – de toksiske virkninger volder særlig betænkelighed (f.eks. alvorlige/svære virkninger) – der er tegn på en virkning, som på grundlag af de foreliggende oplysninger ikke kan karakteriseres fyldetsgørende med hensyn til toksikologiske egenskaber og/eller risiko; i sådanne tilfælde kan det også være mere hensigtsmæssigt at udføre særlige toksikologiske undersøgelser, tilrettelagt med henblik på sådanne virkninger (f.eks. immunotoksicitet eller neurotoksicitet) – der er særlige betænkeligheder vedrørende eksponeringen (f.eks. anvendelse i forbrugerprodukter, der fører til et eksponeringsniveau tæt på den dosis, hvor der kan forventes toksisk virkning for mennesker).
6.7. Reproduktionstoksicitet **6.7.4. Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer**, én dyreart, hun- og handyr, idet den mest hensigtsmæssige indgiftsvej vælges efter den forventede eksponeringsvej for mennesker, medmindre en sådan undersøgelse allerede er forelagt i henhold til kravene i bilag VII.	6.7.4. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis: – stoffet vides at være et genotoksisk carcinogen, og der er indført passende risikostyringsforanstaltninger – stoffet vides at være mutagent over for bakterier, og der er indført passende risikostyringsforanstaltninger – stoffet har lav toksikologisk aktivitet (ingen tegn på toksicitet ses i nogen af de foreliggende undersøgelser), det ud fra toksikokinetiske data kan vises, at der ikke sker systemisk absorption via de relevante eksponeringsveje (f.eks. fordi koncentrationen i plasma/blod er under detektionsgrænsen ved anvendelse af en følsom metode, og hverken stoffet eller dets metabolitter optræder i urin, galde eller udåndingsluft), og der ingen eller kun ubetydelig eksponering er af mennesker.
	6.9. **En carcinogenicitetsundersøgelse** kan foreslås af registranten eller kan kræves af den

	kompetente myndighed i den evaluerende medlemsstat i henhold til artikel 39, 40 eller 44, hvis: – stoffet finder udbredt anvendelse og spredes i miljøet, eller der er tegn på hyppig eller langvarig eksponering af mennesker; og – stoffet er klassificeret som mutagent af klasse 3, eller undersøgelsen (-erne) med gentagen dosering viser, at stoffet kan fremkalde hyperplasi og/eller præneoplastiske forandringer.

7. ØKOTOKSIKOLOGISKE OPLYSNINGER

KOLONNE 1 OBLIGATORISKE STANDARDOPLYSNINGER	KOLONNE 2 SÆRLIGE REGLER FOR TILPASNING AF REGLERNE I KOLONNE 1
7.2. Nedbrydning **7.2.1. Biotisk** 7.2.1.5. Yderligere bekræftende test af biologiske nedbrydningshastigheder (aerobe og/eller anaerobe) i delmiljøer (vand, sediment, jord) med særlig vægt på identifikation af de mest relevante nedbrydningsprodukter.	7.2. Yderligere nedbrydningsforsøg skal foreslås, hvis den kemiske sikkerhedsvurdering i henhold til bilag I tyder på, at yderligere undersøgelse af stoffets nedbrydning er nødvendig. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af sikkerhedsvurderingen.
7.3. Skæbne og opførsel i miljøet	7.3. Yderligere forsøg skal foreslås af registranten, hvis den kemiske sikkerhedsvurdering i henhold til bilag I tyder på, at yderligere undersøgelse af stoffets skæbne og opførsel er nødvendig. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af sikkerhedsvurderingen.

7.3.4. Yderligere undersøgelser af skæbne og opførsel i miljøet	
7.4. Virkninger på terrestriske organismer **7.4.4. Langtidstoksicitetsundersøgelse i regnorme**, medmindre den allerede er forelagt i henhold til kravene i bilag VII. **7.4.5. Langtidstoksicitetsundersøgelse i hvirvelløse jordlevende dyr** bortset fra regnorme, medmindre den allerede er forelagt i henhold til kravene i bilag VII. **7.4.6. Langtidstoksicitetsundersøgelse i planter**, medmindre den allerede er forelagt i henhold til kravene i bilag VII.	7.4. Langtidstoksicitetsundersøgelse skal foreslås af registranten, hvis sammenholdelse af (den forventede) eksponering af miljøet med resultaterne af korttidstoksicitetsundersøgelse(r) viser behov for yderligere undersøgelser af virkningerne på terrestriske organismer. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af denne sammenholdelse. Disse undersøgelser behøver ikke udføres, hvis direkte eller indirekte eksponering af jord-delmiljøet er usandsynlig.
7.5. Langtidstoksicitet i sedimentlevende organismer	7.5. Langtidstoksicitetsundersøgelse skal foreslås af registranten, hvis sammenholdelse af (den forventede) eksponering af miljøet med resultaterne af korttidstoksicitetsundersøgelse(r) viser behov for yderligere undersøgelser af virkningerne på sedimentlevende organismer. Valget af hensigtsmæssig(e) undersøgelse(r) afhænger af resultaterne af sikkerhedsvurderingen.
7.6. Langtidstoksicitetsundersøgelse i fugle	7.6. Undersøgelsen behøver ikke udføres, hvis direkte eller indirekte eksponering af fugle er

	usandsynlig.

9. PÅVISNINGS- OG ANALYSEMETODER

På anmodning skal gives en beskrivelse af de analysemetoder, der er anvendt til de delmiljøer, som der er udført undersøgelser af. Hvis analysemetoderne ikke foreligger, skal dette begrundes.

BILAG IX

ALMINDELIGE REGLER FOR TILPASNING AF STANDARDTESTPROGRAMMET I BILAG V-VIII

Bilag V-VIII indeholder det obligatoriske standardtestprogram for alle stoffer, der fremstilles eller importeres i en mængde på:

– 1 ton eller derover i henhold til artikel 11, stk. 1, litra a),

– 10 tons eller derover i henhold til artikel 11, stk. 1, litra b),

– 100 tons eller derover i henhold til artikel 11, stk. 1, litra c),

– 1000 tons eller derover i henhold til artikel 11, stk. 1, litra d).

Ud over de særlige regler i kolonne 2 i bilag V-VIII gælder det, at en registrant kan anvende standardtestprogrammet i henhold til de almindelige regler i punkt 1 i dette bilag. De kompetente myndigheder i den evaluerende medlemsstat kan give tilladelse til disse tilpasninger til standardtestprogrammet.

1. DER SYNES IKKE AT VÆRE VIDENSKABELIGT BELÆG FOR TESTNING

1.1. Anvendelse af foreliggende data

1.1.1. Data vedrørende fysisk-kemiske egenskaber fra forsøg, der ikke er udført i henhold til GLP eller bilag X

Data anses for ækvivalente med data fra den tilsvarende test i bilag X, når følgende betingelser er opfyldt:

(1) dataene er egnede til brug ved klassificering, mærkning og risikovurdering, og

(2) der gives fyldestgørende og holdbar dokumentation af den pågældende undersøgelse.

1.1.2. Data fra dyreforsøg, der ikke er udført i henhold til GLP eller bilag X

Data anses for ækvivalente med data fra den tilsvarende test i bilag X, når følgende betingelser er opfyldt:

(1) dataene er egnede til brug ved klassificering, mærkning og risikovurdering,

(2) der er fyldestgørende og holdbar dækning af de nøgleparametre, der foreskrives undersøgt i den tilsvarende test i bilag X,

(3) eksponeringsvarigheden er sammenlignelig med eller længere end i den tilsvarende test i bilag X, når eksponeringsvarighed er en relevant parameter, og

(4) der gives fyldestgørende og holdbar dokumentation af den pågældende undersøgelse.

1.1.3. Historiske humane data

Historiske humane data, såsom epidemiologiske undersøgelser af eksponerede populationer, data vedrørende uheldsbetinget eller erhvervsmæssig eksponering samt kliniske undersøgelser, skal tages i betragtning.

For en given sundhedsvirkning afhænger styrken af dataene bl.a. af analysens art og de omfattede parametre samt responsens størrelse og specificitet og dermed virkningens forudsigelighed. Følgende kriterier anvendes til vurdering af, om dataene er fyldestgørende:

(1) korrekt udvælgelse og karakterisering af eksponerede grupper og kontrolgrupper

(2) fyldestgørende karakterisering af eksponeringen

(3) tilstrækkelig lang tids opfølgning med henblik på forekomst af sygdom

(4) valide metoder til iagttagelse af virkningen

(5) behørig hensyntagen til bias og konfunderende faktorer og

(6) rimelig statistisk sikkerhed til underbyggelse af konklusionen.

I alle tilfælde fremlægges fyldestgørende og holdbar dokumentation.

1.2. Oplysningernes vægt (”weight of evidence”)

Flere uafhængige oplysningskilder kan tilsammen have tilstrækkelig weight of evidence til, at man kan formode/slutte, at et stof har en bestemt farlig egenskab eller ikke i tilfælde, hvor oplysninger fra en enkelt kilde alene anses for utilstrækkelige til bygge denne opfattelse på.

Nyudviklede testmetoder, der endnu ikke indgår i bilag X, kan danne grundlag for den konklusion, at stoffet har en bestemt farlig egenskab eller ikke.

Når der foreligger tilstrækkelig weight of evidence for, om en bestemt farlig egenskab er til stede eller ikke:

– skal yderligere testning i hvirveldyr vedrørende den pågældende egenskab undlades,

– kan yderligere testning, som ikke omfatter hvirveldyr, undlades.

I alle tilfælde fremlægges fyldestgørende og holdbar dokumentation.

1.3. Struktur-aktivitet relationer (SAR)

Resultater opnået med valide kvalitative eller kvantitative struktur-aktivitets modeller ((Q)SAR) kan vise, om en bestemt farlig egenskab er til stede eller ikke. Resultater af (Q)SAR kan anvendes i stedet for forsøg, når følgende betingelser opfyldt:

– resultaterne er opnået med en (Q)SAR-model, hvis videnskabelige validitet er godtgjort

– resultaterne er egnede til brug ved klassificering, mærkning og risikovurdering, og

– der gives fyldestgørende og holdbar dokumentation af den anvendte metode.

Agenturet vil i samarbejde med medlemsstaterne udarbejde og give vejledning i vurdering af, hvilke (Q)SAR-modeller der opfylder disse betingelser, og give eksempler.

1.4. *In vitro*-metoder

Ved hjælp af resultater opnået med egnede *in vitro*-metoder kan eksistensen af en bestemt farlig egenskab eventuelt forudsiges. I denne sammenhæng menes med "egnede", at metoderne er tilstrækkeligt veludformede i henhold til internationalt vedtagne kriterier for udformning af tests (f.eks. ECVAM kriterierne for at lade en test indgå i prævalideringsprocessen). Afhængigt af den potentielle risiko kan det være nødvendigt at foretage øjeblikkelig bekræftelse ud over oplysninger, der kræves i bilag V eller VI, eller at foreslå bekræftelse ud over de oplysninger, der kræves i bilag VII eller VIII for den pågældende mængde.

Peger resultaterne fra sådanne *in vitro*-metoder ikke på en bestemt farlig egenskab, skal den relevante test svarende til den pågældende mængde alligevel udføres for at bekræfte det negative resultat, medmindre testning ikke kræves efter bilag V-VIII eller de øvrige regler i bilag IX.

En sådan bekræftende testning kan undlades, når følgende betingelser er opfyldt:

(1) resultaterne er opnået med en in vitro-metode, hvis videnskabelige validitet er fastslået ved en valideringsundersøgelse i overensstemmelse med internationalt vedtagne valideringsprincipper.

(2) resultaterne er egnede til brug ved klassificering, mærkning og risikovurdering, og

(3) der gives fyldestgørende og holdbar dokumentation af den anvendte metode.

1.5. Kategorisering af stoffer og analogisering (”read-across”)

Stoffer, hvis fysisk-kemiske, toksikologiske og økotoksikologiske egenskaber må forventes at svare til hinanden eller følge samme mønster på grund af deres strukturelle lighed, kan anses for en gruppe eller "kategori" af stoffer. Anvendelse af gruppebegrebet forudsætter, at de fysisk-kemiske egenskaber, sundhedsvirkningerne og miljøvirkningerne eller stoffernes skæbne i miljøet kan forudsiges ved interpolation fra data for et referencestof i gruppen til de andre stoffer i gruppen (read-across-metoden eller analogisering). Derved undgår man at skulle teste hvert stof for hver virkning.

Lighederne kan baseres på:

(1) en fælles funktionel gruppe

(2) fælles prækursorer og/eller sandsynlighed for fælles nedbrydningsprodukter fra fysiske og biologiske processer, der fører til stoffer med strukturelle ligheder, eller

(3) et fast mønster i, hvordan styrken af de forskellige egenskaber ændrer sig gennem kategorien.

Anvendes gruppebegrebet, skal stofferne klassificeres og mærkes på dette grundlag.

I alle tilfælde gives der fyldestgørende og holdbar dokumentation.

2. TESTNING ER IKKE TEKNISK MULIG

Testning for en given virkning kan undlades, hvis det ikke er teknisk muligt at udføre undersøgelsen på grund af stoffets egenskaber, f.eks. fordi der er tale om meget letflygtige, stærkt reaktive eller ustabile stoffer eller stoffer, som ved opblanding med vand kan forårsage brand eller eksplosion, eller fordi den ved bestemte test krævede radioaktive mærkning af stoffet ikke er mulig. Vejledningen for testning i bilag X, der mere konkret omhandler de enkelte metoders tekniske begrænsninger, skal altid overholdes.

3. STOFSPECIFIK EKSPONERINGSSTYRET TESTNING

Testning efter bilag VII og VIII kan undlades, afhængigt af de eksponeringsscenarier, der er opstillet i den kemiske sikkerhedsrapport.

I alle tilfælde skal der gives fyldestgørende og holdbar dokumentation.

DA

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER

Bruxelles, den 29.10.2003
KOM(2003) 644 endelig

2003/0256(COD)
2003/0257(COD)

DEL III - Bilag X del A til forslaget til forordning

.

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS FORORDNING

om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) {om persistente organiske miljøgifte}

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

(forelagt af Kommissionen)

{SEC(2003 1171}

BILAG X

INDLEDNING

I bilaget anføres undersøgelsesmetoder til bestemmelse af de fysisk-kemiske, toksikologiske og økotoksikologiske egenskaber, der er opregnet i bilag VII og VIII til direktiv 79/831/EØF. Metoderne er baseret på sådanne, der er anerkendt og anbefalet af kompetente internationale organisationer (navnlig OECD).

Hvor der ikke har foreligget sådanne metoder, er der valgt nationale standardmetoder eller videnskabeligt anerkendte metoder. I almindelighed skal undersøgelserne foretages med stoffet, som det markedsføres. Man bør være opmærksom på, at urenheder kan påvirke undersøgelsesresultaterne.

Hvis metoderne i bilaget til direktiv 79/831/EØF ikke er anvendelige til undersøgelse af en given egenskab, skal anmelderen begrunde valget af alternativ metode.

AFSNIT A: METODER TIL BESTEMMELSE AF FYSISK-KEMISKE EGENSKABER

A.1. SMELTE/FRYSEPUNKT

1. METODE

De fleste af de beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i reference (2) og (3).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder og apparater kan anvendes til bestemmelse af smeltepunktet for kemiske stoffer uanset renheden.

Valg af metode afhænger af arten af det stof, der skal undersøges. Det er således afgørende, om stoffet let, vanskeligt eller slet ikke kan pulveriseres.

For nogle stoffer er bestemmelse af fryse- eller størkningspunkt mere hensigtsmæssigt, og der er i denne metode medtaget standarder for sådanne bestemmelser.

Hvis det som følge af stoffets særlige egenskaber er umuligt at bestemme nogen af ovenstående parametre, kan det være hensigstmæssigt at bestemme et flydepunkt.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Smeltepunktet defineres som den temperatur, ved hvilken faseovergangen fra fast til flydende tilstand finder sted ved atmosfæretryk, og denne temperatur svarer i det ideale tilfælde til temperaturen ved frysepunktet.

Da faseovergangen for mange stoffer finder sted over et temperaturinterval, beskrives den ofte som smeltepunktsintervallet.

Enhedsomregning (K til °C):

$t = T - 273{,}15$, hvor

t er temperaturen i grader celsius (°C), og

T er temperaturen i Kelvin (K).

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest bruges til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Der er i referencerne (4) angivet nogle referencestoffer.

1.4. METODENS PRINCIP

Temperaturen (temperaturintervallet) for faseovergangen fra fast til flydende tilstand eller fra flydende til fast tilstand bestemmes. I praksis bestemmes temperaturen ved begyndende smeltning/frysning og ved endelig smeltning/frysning under opvarmning/afkøling af en prøve af stoffet ved atmosfæretryk. Der er beskrevet fem typer metoder: kapillarmetoder, varmebordsmetoder, frysepunktsbestemmelser, termoanalyse og flydepunktsbestemmelse (som udviklet til mineralolier).

Det kan i nogle tilfælde være mere hensigtsmæssigt at bestemme frysepunktet end smeltepunktet.

1.4.1. Kapillarmetoder

1.4.1.1. *Smeltepunktsapparater med væskebad*

En lille mængde af det findelte stof fyldes i et kapillarrør og pakkes tæt. Røret opvarmes sammen med et termometer, og temperaturstigningen indstilles til mindre end ca. 1 K/min under den egentlige smeltning. Temperaturen ved begyndende og endelig smeltning bestemmes.

1.4.1.2. *Smeltepunktsapparater med metalblok*

Som beskrevet under 1.4.1.1 bortset fra, at kapillarrøret og termometeret er anbragt i en opvarmet metalblok og kan iagttages gennem huller i blokken.

1.4.1.3. *Bestemmelse med fotocelle*

Prøven i kapillarrøret opvarmes automatisk i en metalcylinder. En lysstråle sendes via et hul i cylinderen gennem stoffet og ind på en nøjagtigt indstillet fotocelle. De fleste stoffers optiske egenskaber ændres under smeltning fra at være uigennemsigtige til gennemsigtige. Derved øges den lysmængde, som når frem til fotocellen, og der sendes et stopsignal til en digitalindikator, som viser temperaturen af et platinmodstandstermometer anbragt i varmekammeret. Denne metode kan ikke anvendes for visse stærkt farvede stoffer.

1.4.2. Varmeborde

1.4.2.1. *Koflers varmebænk*

Koflers varmebænk består af to elektrisk opvarmede metalstykker med forskellig varmeledningsevne og er udformet sådan, at dens temperaturgradient i længderetningen er næsten lineær. Varmebænken kan spænde over temperaturområdet fra 283 K til 573 K og er forsynet med en særlig anordning til temperaturaflæsning, som består af en skyder med en viser og en fane, og som er særligt udformet til den enkelte bænk. Smeltepunktet bestemmes ved, at det pågældende stof lægges i et tyndt lag direkte på bænkens overflade, hvorefter der på få sekunder opstår en skarp skillelinje mellem flydende og fast fase. Temperaturen på skillelinjen aflæses ved at indstille viseren på denne.

1.4.2.2. *Smeltemikroskop*

Der anvendes en række varmeborde med mikroskop til smeltepunktsbestemmelser på meget små stofmængder. I de fleste varmeborde måles temperaturen med et følsomt termoelement, men undertiden anvendes også kviksølvtermometre. Et typisk smeltepunktsapparat, bestående af varmebord med mikroskop, er udstyret med et varmekammer indeholdende en metalplade, hvorpå prøven anbringes i en slæde. I midten af metalpladen er der et hul, hvorigennem der kan sendes lys fra mikroskopets belysningsspejl. Når apparatet er i brug, er kammeret lukket med en glasplade for at forhindre luftens adgang til prøven.

Opvarmningen af prøven reguleres med en rheostat. Kræves meget nøjagtige målinger kan der for optisk anisotrope stoffer anvendes polariseret lys.

1.4.2.3. *Meniskmetoden*

Denne metode anvendes kun for polyamider.

Den temperatur, ved hvilken forskydningen af en silikonoliemenisk, som er indesluttet mellem et varmebord og et dækglas hvilende på polyamid-prøveemnet, iagttages visuelt.

1.4.3. Metode til bestemmelse af frysepunkt

Prøven anbringes i en særlig type reagensglas og anbringes i et apparat til bestemmelse af frysepunkt. Prøven afkøles under stadig langsom omrøring, og temperaturen måles med passende mellemrum. Når temperaturen er

konstant ved flere aflæsninger, anføres denne temperatur (korrigeret for termometerfejl) som frysepunktet.

Underafkøling skal undgås ved, at der opretholdes ligevægt mellem den faste fase og væskefasen.

1.4.4. **Termoanalyse**

1.4.4.1. *Diffential termoanalyse (DTA)*

Ved denne metode registreres temperaturforskellen mellem stoffet og et referencemateriale som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm (smeltning) eller exoterm (frysning) afvigelse fra den registrerede grundlinje.

1.4.4.2. *Differential scanning kalorimetri (DSC)*

Ved denne metode registreres forskellen i den energimængde, der tilføres stoffet og et referencemateriale, som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. Denne forskel svarer til den energimængde, der er nødvendig for at opretholde en temperaturforskel på nul mellem stoffet og referencematerialet. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm (smeltning) eller exoterm (frysning) afvigelse fra den registrerede grundlinje.

1.4.5. **Flydepunkt**

Denne metode er udviklet til mineralolier og er egnet til olieagtige stoffer med lavt smeltepunkt.

Efter først at være opvarmet afkøles prøven med en bestemt hastighed, og dens flydeegenskaber undersøges med 3 K's mellemrum. Den laveste temperatur, ved hvilken der kan iagttages bevægelse i stoffet, registreres som flydepunktet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendelighed og nøjagtighed for de forskellige metoder til bestemmelse af smeltepunkt/smeltepunktsinterval er angivet i følgende tabel:

TABEL: METODERNES ANVENDELIGHED

A. Kapillarmetoder

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperatur-område	Skønnet (1) nøjagtighed	Foreliggende standard
Smeltepunkts-apparater med væskebad	ja	enkelte	273 til 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Smeltepunkts-apparater med metalblok	ja	enkelte	293 til >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Bestemmelse med fotocelle	ja	adskillige ved hjælp af særligt udstyr	253 til 573 K	± 0,5 K	

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed

B. Varmeborde og frysemetoder

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperatur-område	Skønnet (1) nøjagtighed	Foreliggende standard
Koflers varmebænk	ja	nej	283 K til >573 K	± 1,0 K	ANSI/ ASTM D 345176
Smeltemikroskop	ja	enkelte	273 K til >573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskmetode	nej	kun for polyamider	293 K til >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Frysepunktsmetoder	ja	ja	223 K til 573 K	± 0,5 K	f.eks. BS 4695

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed

C. Termoanalyse

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperatur-område	Skønnet (1) nøjagtighed	Foreliggende standard
Differential termoanalyse	ja	ja	173 K til 1 273 K	op til 600 K ± 0,5 K op til 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differential scanning kalorimetri	ja	ja	173 K til 1 273 K	op til 600 K ± 0,5 K op til 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed

D. Flydepunkt

Målemetode	For stoffer, som kan pulveriseres	For stoffer, som ikke let pulveriseres	Temperatur-område	Skønnet (1) nøjagtighed	Foreliggende standard
Flydepunkt	for mineraloliер og olieagtige stoffer	for mineraloliер og olieagtige stoffer	223 K til 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed

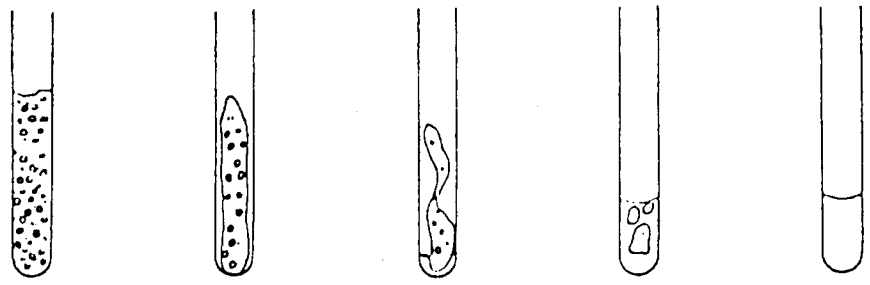
1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Fremgangsmåden er for næsten alle undersøgelsesmetoderne beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillægget).

1.6.1. **Kapillarrørsmetoder**

Fint pulveriserede stoffer udviser ved langsom opvarmning sædvanligvis et smeltningsforløb som vist på figur 1.

Figur 1



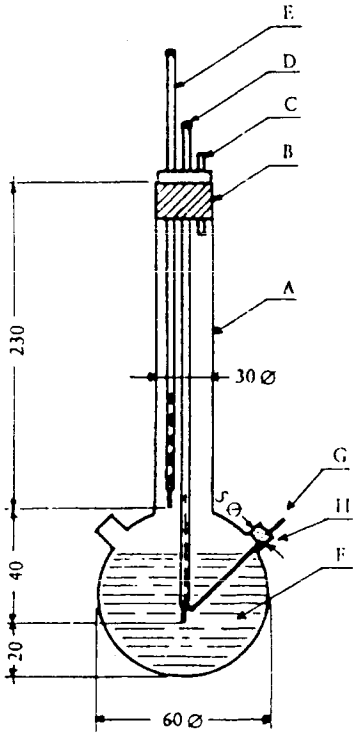
Trin A	(begyndende smeltning): Små dråber fordeler sig jævnt over kapillarrørets indervæg.
Trin B	Der opstår et mellemrum mellem prøven og indervæggen som følge af prøvens skrumpning under smeltningen.
Trin C	Den indskrumpne prøve begynder at synke ned på bunden og blive flydende.
Trin D	Der dannes en ubrudt væskeoverflade, men en væsentlig del af prøven består stadig af fast stof.
Trin E	(endelig smeltning): Der er ingen faste partikler.

Under smeltepunktsbestemmelsen noteres temperaturerne ved begyndende og endelig smeltning.

1.6.1.1 *Smeltepunktsapparater med væskebad*

Figur 2 viser en type standardiseret smeltepunktsapparat (JIS K 0064). Apparatet er fremstillet af glas, og alle mål er angivet i mm .

Figur 2



A: Målebeholder

B: Prop

C: Udluftningshul

D: Termometer E: Hjælpetermometer

F: Badvæske

G: Kapillarrør af glas; længde 80 — 100 mm ; indre diameter 1,0 ± 0,2 mm ; vægtykkelse 0,2 — 0,3 mm

H: siderør

Badvæske:

Der vælges en passende væske. Valget afhænger af, hvor højt et smeltepunkt der skal bestemmes, f.eks. paraffinolie for smeltepunkter op til 473 K og silikonolie for smeltepunkter op til 573 K.

For smeltepunkter over 523 K kan der anvendes en blanding af 3 dele svovlsyre og 2 dele kaliumsulfat (masseforhold). Anvendes denne blanding, skal der træffes passende sikkerhedsforholdsregler.

Termometer:

Man bør kun anvende termometre, som opfylder kravene i de følgende eller tilsvarende standarder:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Fremgangsmåde:

Det tørre stof pulveriseres fint i en morter og fyldes i kapillarrøret, som er lukket i den ene ende, således at fyldningshøjden er ca. 3 mm efter tæt pakning. For at opnå en ensartet pakket prøve lader man kapillarrøret falde fra en højde af ca. 700 mm gennem et lodret glasrør ned på et urglas.

Det fyldte kapillarrør anbringes i badet, således at den midterste del af termometerets kviksølvbeholder berører den del af kapillarrøret, som prøven befinder sig i. Sædvanligvis anbringes kapillarrøret i apparatet, når badets temperatur er ca. 10 K under smeltepunktet.

Badvæsken opvarmes med en temperaturstigning på ca. 3 K/min under omrøring af væsken. Når temperaturen er ca. 10 K under det forventede smeltepunkt, indstilles temperaturstigningen til højst 1 K/min.

Beregning:

Smeltepunktet beregnes således:

$$T = T_D + 0{,}00016\,(T_D - T_E)\,n$$

hvor

T = korrigeret smeltepunktstemperatur i K

T_D = temperaturaflæsning af termometer D i K

T_E = temperaturaflæsning af termometer E i K

n = antallet af gradinddelinger på den udestående del af termometer D's kviksølvsøjle.

1.6.1.2. *Smeltepunktsapparater med metalblok*

Apparat:

Dette består af:

— en cylindrisk metalblok, hvis øverste del er hul og danner et kammer (se figur 3)

— en metalprop med to eller flere huller som muliggr anbringelse af rør i metalklodsen

— et opvarmningssystem for metalklodsen, f.eks. i form af en elektrisk modstand indbygget i blokken

— en rheostat til regulering af energitilførslen, hvis der anvendes elektrisk opvarmning

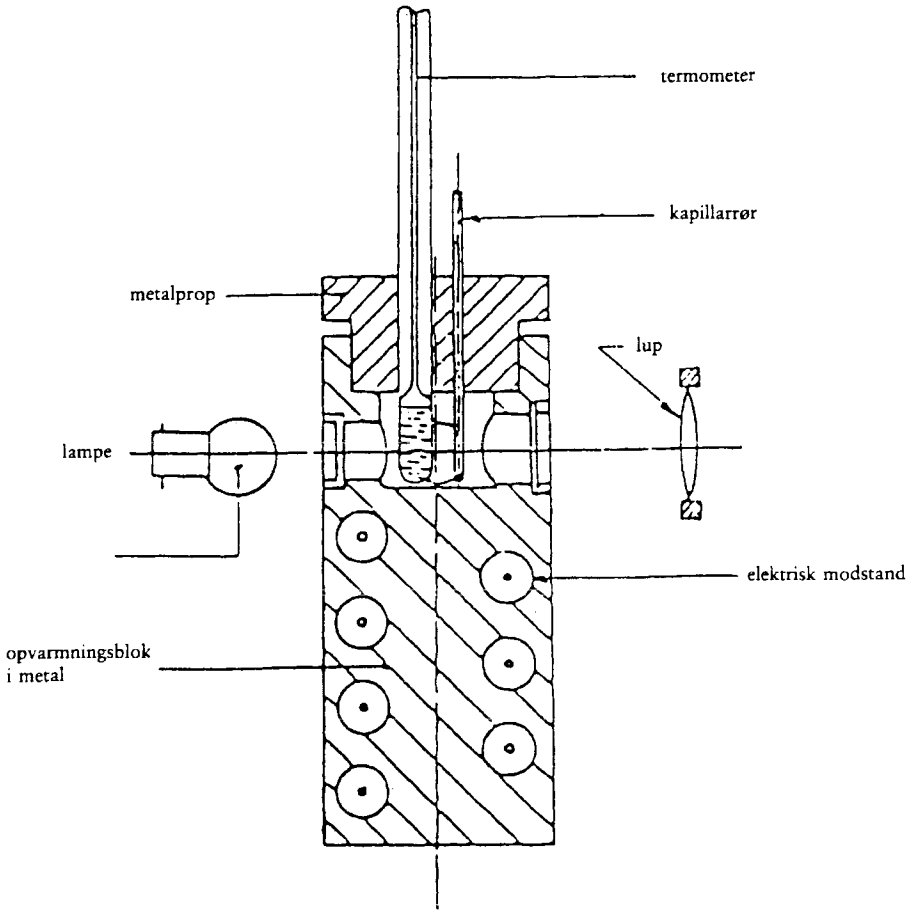
— fire vinduer af varmeresistent glas i kammerets sidevægge, anbragt diametralt og vinkelret på hinanden. Foran et af disse vinduer er der anbragt en lup til iagttagelse af kapillarrøret. De tre andre vinduer tjener til belysning af indersiden af kammeret ved hjælp af lamper

— et kapillarrør af varmeresistent glas lukket i den ene ende (se 1.6.1.1).

Termometer:

Se standarderne i 1.6.1.1. Termoelektriske måleinstrumenter med tilsvarende nøjagtighed kan også anvendes.

Figur 3



1.6.1.3. *Bestemmelse med fotocelle*

Apparat og fremgangsmåde:

Apparatet består af et metalkammer med et automatisk opvarmningssystem. Tre kapillarrør fyldes som i 1.6.1.1 og anbringes i ovnen.

Der er mulighed for flere lineære_temperaturstigninger til kalibrering af apparatet, og temperaturstigningen indstilles elektrisk til en passende forudvalgt konstant og lineær hastighed. Skrivere viser den øjeblikkelige ovntemperatur og temperaturen af stoffet i kapillarrørene.

1.6.2. **Varmeborde**

1.6.2.1. *Koflers varmebænk*

Se tillæg.

1.6.2.2. *Smeltemikroskop*

Se tillæg.

1.6.2.3. *Meniskmetode (for polyamider)*

Se tillæg.

Opvarmingshastigheden ved smeltepunktet skal være mindre end 1 K/min.

1.6.3. **Metoder til bestemmelse af frysepunkt**

Se tillæg.

1.6.4. **Termoanalyse**

1.6.4.1. *Diffential termoanalyse*

Se tillæg

1.6.4.2. *Differential scanning kalorimetri*

Se tillæg

1.6.5. **Bestemmelse af flydepunkt**

Se tillæg

2. DATA

I visse tilfælde er termometerkorrektion nødvendig.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder) og eventuelt indledende oprensningstrin

— den skønnede nøjagtighed.

Som smeltepunkt anføres gennemsnittet af mindst to målinger, der ligger inden for den skønnede nøjagtighed (jf. tabellerne).

Hvis forskellen mellem temperaturen ved begyndende og endelig smeltning ligger inden for metodens nøjagtighed, angives temperaturen ved den endelige smeltning som smeltepunktet; i modsat fald angives begge temperaturer.

Hvis stoffet dekomponerer eller sublimerer, inden smeltepunktet er nået, anføres den temperatur, hvor dette fænomen er iagttaget.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

Tillæg

Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder:

1. Kapillarmetoder

1.1. Smeltepunktsapparater med væskebad

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

1.2. Smeltepunktsapparater med metalblok

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of »melting point«

2. Varmeborde

2.1. Koflers varmebænk

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Smeltemikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniskmetode (polyamider)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of »melting point«
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines du polyamides. Détermination du »point de fusion«. Méthode du ménisque

3. **Metoder til bestemmelse af frysepunkt**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for determination of melting point of petroleum wax (cooling curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la temperature de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termoanalyse**

4.1. Differential termoanalyse

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Differential scanning kalorimetri

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Bestemmelse af flydepunkt**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieprodukten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test methods for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point

A.2. KOGEPUNKT

1. METODE

Flertallet af de beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i reference (2) og (3).

1.1. INDLEDNING

De her beskrevne metoder kan anvendes for alle væsker og lavtsmeltende stoffer, forudsat at der ikke indtræder nogen kemisk reaktion under kogepunktet (f.eks. autooxidation, omlejring eller nedbrydning). Metoderne kan anvendes for alle væsker uanset renheden.

De metoder, hvor der benyttes bestemmelse med fotocelle, og de, der er baseret på termoanalyse, fremhæves specielt, da de kan benyttes til bestemmelse af både smelte-og kogepunkt. Desuden kan disse målinger udføres automatisk.

Den dynamiske metode har den fordel, at den også kan benyttes til bestemmelse af damptryk, og det er ikke nødvendigt at korrigere kogepunktstemperaturen til standardtryk (101,325 kPa), da standardtrykket kan indstilles med en pressostat under målingen.

Bemærkninger

Urenheders indflydelse på kogepunktsbestemmelsen afhænger stærkt af deres art. Hvis der i prøven er flygtige urenheder, som vil kunne få indflydelse på resultaterne, kan stoffet eventuelt renses.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Standardkogepunktet defineres som den temperatur, ved hvilken en væskes damptryk er 101,325 kPa.

Måles kogepunktet ikke ved standardatmosfæretryk, kan damptrykkets afhængighed af temperaturen beskrives ved Clausius-Clapeyron's ligning:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + \text{konstant}$$

hvor:

p = stoffets damptryk i pascal

ΔH_v = stoffets fordampningsvarme i $J \cdot mol^{-1}$

R = gaskonstanten = 8,314 $J\ mol^{-1}\ K^{-1}$

T = den absolutte temperatur i K

Kogepunktet opgives i forhold til det aktuelle tryk under målingen.

Omregninger

Tryk (enhed kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa
(»bar« er stadig tilladt, men anbefales ikke)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr
(enhederne »mm Hg« og »Torr« er ikke tilladt)

1 atm = standardatmosfære = 101 325 Pa
(»atm«-enheden er ikke tilladt).

Temperatur (enhed K)

$t = T - 273{,}15$

t er temperaturen i grader celsius (°C)

T er termodynamisk temperaturen i kelvin (K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Der er i de metoder, der er anført i tillægget, angivet nogle referencestoffer.

1.4. METODENS PRINCIP

Der er fem metoder til bestemmelse af kogepunkt (kogepunktsinterval), som er baseret på måling af den temperatur, ved hvilken prøven koger, og to metoder baseret på termoanalyse.

1.4.1. Bestemmelse ved hjælp af ebulliometer

Ebullitometre blev oprindeligt udviklet til molekylvægtsbestemmelse via kogepunktsforhøjelse, men de er også velegnede til nøjagtige kogepunktsbestemmelser. Et meget enkelt apparat er beskrevet i ASTM D 1120-72 (se tillæg). I dette apparat opvarmes væsken under ligevægtsbetingelser ved atmosfæretryk, indtil den koger.

1.4.2. Dynamisk metode

Ved denne metode måles dampens fortætningstemperatur ved hjælp af et egnet termometer anbragt i tilbagesvaleren under kogning. Trykket kan varieres ved denne metode.

1.4.3. Destillationsmetode til bestemmelse af kogepunkt

Ved denne metode destilleres væsken, og dampens fortætningstemperatur samt destillatmængden måles.

1.4.4. Siwoloboff's metode

En prøve opvarmes i et prøverør, som er nedsænket i et varmebad. Et tilsmeltet kapillarrør med en luftboble i den nederste ende er nedsænket i prøverøret.

1.4.5. Bestemmelse med fotocelle

Der foretages automatisk fotoelektrisk måling af opstigende bobler under anvendelse af Siwoloboff's princip.

1.4.6. Diffential termoanalyse

Ved denne metode registreres temperaturforskellen mellem stoffet og et referencemateriale som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm afvigelse (kogning) fra den registrerede grundlinje.

1.4.7. **Differential scanning kalorimetri**

Ved denne metode registreres forskellen i den energimængde, der tilføres stoffet og et referencemateriale, som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. Denne forskel svarer til den energimængde, der er nødvendig for at opretholde en temperaturforskel på nul mellem stoffet og referencematerialet. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm afvigelse (kogning) fra den registrerede grundlinje.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendelighed og nøjagtighed for de forskellige metoder til bestemmelse af kogepunkt/kogepunktsinterval er angivet i tabel 1.

TABEL 1: SAMMENLIGNING AF METODERNE

Målemetode	Skønnet nøjagtighed	Foreliggende standard
Ebulliometer	± 1,4 K (op til 373 K) (1)(2) ± 2,5 K (op til 600 K) (1)(2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dynamisk metode	± 0,5 K (op til 600 K) (2)	
Destillationsforløb (kogepunkts-interval)	± 0,5 k (op til 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboff's metode	± 2 K (op til 600 K) (2)	
Bestemmelse med fotocelle	± 0,3 K (ved 373 K) (2)	
Differential termoanalyse	± 0,5 K (op til 600 K) ± 2,0 K (op til 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differential scanning kalorimetri	± 0,5 K (op til 600 K) ± 2,0 K (op til 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Denne nøjagtighed gælder kun for det simple apparat, som er beskrevet i f.eks. ASTM D 1120-72, den kan forbedres med mere raffinerede ebulliometre.
(2) Gælder kun for rene stoffer. Anvendelse under andre betingelser skal begrundes.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Nogle af metodernes fremgangsmåder er beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillæg).

1.6.1. **Ebulliometer**

Se tillæg.

1.6.2. **Dynamisk metode**

Se metode A.4 til bestemmelse af damptryk.

Den kogetemperatur, der iagttages ved et tryk på 101,325 kPa, noteres.

1.6.3. **Destillationsforløb (kogepunktsinterval)**

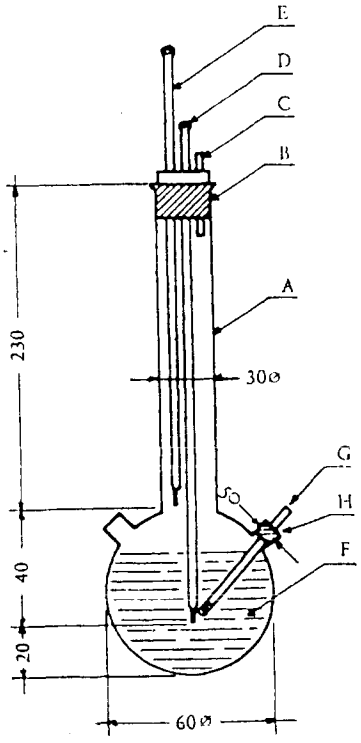
Se tillæg.

1.6.4. **Siwoloboff's metode**

Prøven opvarmes i et smeltepunktsapparat i et prøverør med en diameter på ca. 5 mm (figur 1).

Figur 1 viser en model af et standardiseret smelte-og kogepunktsapparat (JIS K 0064) (fremstillet af glas, alle mål i millimeter).

Figur 1

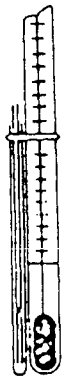


A: Målebeholder
B: Prop
C: Udluftning
D: Termometer
E: Hjælpetermometer
F: Badvæske
G: Prøverør, ydre diameter maks. 5 mm, med ca. 100 mm langt kapillarrør med indre diameter maks. 1 mm og vægtykkelse ca. 0,2-0,3 mm
H: siderør

Et kapillarrør, som er tilsmeltet ca. 1 cm over den nederste ende, anbringes i prøverøret. Der fyldes så meget prøve i, at den tilsmeltede del af kapillarrøret befinder sig under væskeoverfladen. Prøverøret med kapillarrøret fastgøres til termometeret med en elastik eller fastholdes støttet fra siden (se figur 2).

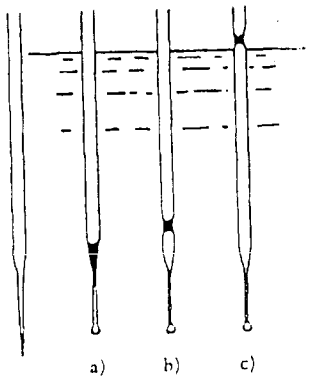
Figur 2

Siwoloboff's princip



Figur 3

Modificeret princip



Badvæsken vælges under hensyntagen til kogepunktet. Ved en temperatur på op til 573 K kan der benyttes silikonolie. Flydende paraffin må kun anvendes op til 473 K. Badvæsken opvarmes først med en hastighed på 3 K pr. minut under omrøring. Ca. 10 K under det forventede kogepunkt sænkes varmetilførslen, så temperaturstigningen bliver mindre end 1 K pr. minut. Når temperaturen nærmer sig kogepunktet, begynder der at strømme bobler ud af kapillarrøret.

Kogepunktet er den temperatur, hvor boblestrømmen under et kortvarigt temperaturfald standser og væsken begynder at stige op i kapillarrøret. Termometeraflæsningen viser stoffets kogepunkt.

I det modificerede princip (figur 3) bestemmes kogepunktet i et smeltepunktskapillarrør. Det trækkes ud til en ca. 2 cm lang tynd spids (a), og en smule af prøven suges op heri. Den åbne ende af det tynde kapillarrør tilsmeltes, så der dannes en lille luftboble ved enden. Ved opvarmning i smeltepunktsapparatet (b) udvider luftboblen sig. Kogepunktet ligger ved den temperatur, hvor stofproppen når op i højde med badvæskens overflade (c).

1.6.5. **Bestemmelse med fotocelle**

Prøven opvarmes i et kapillarrør i en opvarmet metalblok.

Via passende huller i blokken sendes der en lysstråle gennem stoffet ind til en nøjagtigt kalibreret fotocelle.

Medens temperaturen i prøven stiger, undviger der enkelte bobler fra kapillarrøret. Når kogepunktet er nået, vokser antallet af bobler voldsomt. Herved ændres intensiteten af det lys, som fotocellen modtager, så der sendes et stopsignal til den indikator, der viser temperaturen af et platinmodstandstermometer, der er anbragt i blokken.

Denne metode er særlig anvendelig, da den kan benyttes til bestemmelser under stuetemperatur ned til 253,15 K (– 20 °C) uden ændringer ved apparaturet. Instrumentet skal blot anbringes i et kuldebad.

1.6.6. **Termoanalyse**

1.6.6.1. *Differential termoanalyse*

Se tillæg.

1.6.6.2. *Differential scanning kalorimetri*

Se tillæg.

2. **DATA**

Ved små afvigelser fra standardtryk (maks. ± 5 kPa) korrigeres kogepunktstemperaturerne ved hjælp af Sidney-Youngs ligning:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

hvor $\Delta p = (101{,}325 - p)$ [bemærk fortegnet]

p = trykket målt i kPa

f_T = kogepunktets ændring med trykket i K/kPa

T = målt kogepunkt i K

T_n = kogepunkt i K, korrigeret til standardtryk

I ovennævnte nationale og internationale standarder findes der temperaturkorrektionsfaktorer f_T for mange stoffer og udtryk til tilnærmelse af dem.

Eksempelvis anføres i DIN 53171 følgende grove korrektioner for opløsningsmidler i maling:

TABEL 2: TEMPERATURKORREKTIONSFAKTORER f_T

Temperatur T	korrektionsfaktor f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder) og eventuel indledende rensning

— den skønnede nøjagtighed.

Som kogepunkt anføres gennemsnittet af mindst to målinger, der ligger inden for den skønnede nøjagtighed (jf. tabel 1).

De målte kogetemperaturer og gennemsnittet heraf skal anføres, og det tryk, hvorved målingerne er foretaget, opgives i kPa. Trykket skal helst ligge nær standardatmosfæretryk.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

Tillæg

Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder:

1. Ebulliometer

ASTM D 1120-72 Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Destillationsforløb (kogepunktsinterval)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Differential termoanalyse og differential scanning kalorimetri**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

A.3. RELATIV MASSEFYLDE

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i reference (2).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder til bestemmelse af relativ massefylde kan anvendes for faste stoffer og væsker uanset renheden. De forskellige metoder, som kan anvendes, er anført i tabel 1.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den relative massefylde, D_4^{20}, af faste stoffer og væsker er forholdet mellem massen af et rumfang af det undersøgte stof bestemt ved 20 °C og massen af det samme rumfang vand bestemt ved 4 °C. Den relative massefylde er dimensionsløs.

Massefylden, ρ, af et stof er dets masse m divideret med dets rumfang v.

Massefylden, ρ, opgives i kg/m^3 (SI-enheder).

1.3. REFERENCESTOFFER (1) (3)

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. METODERNES PRINCIP

Der benyttes fire typer metoder.

1.4.1. **Opdriftsmetoder**

1.4.1.1. *Aræometer* (for væsker)

Der kan opnås tilstrækkelig nøjagtige og hurtige massefyldebestemmelser med aræometre, hvor massefylden af en væske udledes af flydehøjden ved aflæsning på en skala.

1.4.1.2. *Hydrostatisk vægt* (for væsker og faste stoffer)

Forskellen mellem massen af en prøve i henholdsvis atmosfærisk luft og en passende væske (f.eks. vand) kan anvendes til at bestemme dens massefylde.

For faste stoffer er den fundne massefylde kun repræsentativ for den bestemte prøve, som er anvendt til bestemmelsen. Til bestemmelse af væskers massefylde vejes et legeme med kendt rumfang v først i atmosfærisk luft og dernæst i væsken.

1.4.1.3. *Metode med nedsænket legeme* (for væsker) (4)

Ved denne metode bestemmes en væskes massefylde ud fra forskellen mellem resultaterne af vejning af væsken før og efter nedsænkning af et legeme med kendt rumfang heri.

1.4.2. **Pyknometermetoder**

Pyknometre af forskellig udformning og med kendt rumfang kan anvendes for faste stoffer og væsker. Massefylden beregnes ud fra masseforskellen mellem det fulde og det tomme pyknometer og dets kendte rumfang.

1.4.3. **Luftsammenligningspyknometer** (for faste stoffer)

Massefylden af et fast stof i enhver form kan bestemmes ved stuetemperatur med et gassammenligningspyknometer. Rumfanget af en prøve af stoffet måles i atmosfærisk luft eller i en inaktiv luftart i en beholder med korrigeret rumfangsinddeling. Til beregning af massefylden foretages efter rumfangsbestemmelsen en bestemmelse af prøvens masse.

1.4.4. **Oscillerende densitometer** (5) (6) (7)

Massefylden af en væske kan bestemmes med et oscillerende densitometer. En mekanisk oscillator i form af et U-rør sættes i svingning ved sin resonansfrekvens, der afhænger af dens masse. Når der indføres en prøve heri, ændres oscillatorens resonansfrekvens. Apparatet kalibreres med to væsker med kendt massefylde. Disse stoffer vælges fortrinsvis således, at deres massefylde ligger i hver sin ende af det pågældende måleområde.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendeligheden af de forskellige metoder, der anvendes til bestemmelse af den relative massefylde, er opstillet i tabellen.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Tillægget indeholder en liste over nogle standarder, hvorfra yderligere tekniske detaljer kan hentes.

Målingerne skal udføres ved 20 °C, og der foretages mindst to bestemmelser.

2. DATA

Se standarderne.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (art og urenheder) og eventuel indledende rensning.

Den under 1.2 definerede relative massefylde D_4^{20} rapporteres tillige med det undersøgte stofs fysiske tilstand.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand, skal anføres.

TABEL: METODERNES ANVENDELIGHED

Målemetode	Massefylde		Maksimal dynamisk viskositet	Foreliggende standarder
	fast stof	væske		
1.4.1.1. Aræometer		ja	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hydrostatik vægt				
a) faste stoffer	ja			ISO 1183 (A)
b) væsker		ja	5 Pa S	ISO 901 og 758
1.4.1.3. Metode med nedsænket legeme		ja	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO 3507
a) faste stoffer	ja			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) væsker		ja	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Luftssammenligningspyknometer	ja			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oscillerende densitometer		ja	5 Pa s	

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.11, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

Tillæg

Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder:

1. **OPDRIFTSMETODER**

1.1. Aræometer

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
	Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation
	Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Hydrostatisk vægt

For faste stoffer

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method
ASTM D 792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

For væsker

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 og ASTM D 1481-62

ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Metode med nedsænket legeme

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method

2. **PYKNOMETERMETODER**

2.1. For væsker

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for ikke-flygtige væsker, som ikke er for tyktflydende)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for væsker med kinematisk viskositet under 100, 10^{-6} m^2 s^{-1} ved 15 °C)

DIN 12800	Sprengel pycnometer (for samme væsker som DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for væsker med kinematisk viskositet under 100, 10^{-6} m^2 s^{-1} ved 20 °C; desuden særligt egnet til kulbrinter og vandige opløsninger samt væsker med ret højt damptryk, ca. 1 bar ved 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for alle tyktflydende væsker, som ikke har for højt damptryk, specielt også for malinger, lakker og asfalt)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for samme væsker som DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (hovedsagelig for ethanol/vand-blandinger)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for væsker, som ikke er for tyktflydende)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products — chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method

2.2. For faste stoffer

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. LUFTSAMMENLIGNINGSPYKNOMETER

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

A.4. DAMPTRYK

1. METODE

Flertallet af de beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i reference (2) og (3).

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets struktur, smeltepunkt og kogepunkt.

Der findes ikke en enkelt metode, som kan anvendes i hele damptryksområdet. Derfor anbefales der flere forskellige metoder til måling af damptryk fra $< 10^{-4}$ til 10^5 Pa.

Urenheder vil normalt påvirke damptrykket; denne påvirkning afhænger stærkt af urenhedens art.

Er der i prøven flygtige urenheder, der kunne tænkes at påvirke resultatet, kan man rense stoffet. Det kan også være hensigtsmæssigt at oplyse damptrykket for den tekniske kvalitet.

I nogle af de her beskrevne metoder anvendes der apparatur med metaldele; der skal tages hensyn hertil, når der udføres test med ætsende stoffer.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Et fast eller flydende stofs damptryk defineres som mætningstrykket over stoffet. I termodynamisk ligevægt er et rent stofs damptryk kun en funktion af temperaturen.

Den SI-enhed for tryk, som anvendes, er pascal (Pa).

Nedenfor er anført nogle enheder, som tidligere har været anvendt, og deres omregningsfaktorer:

1 Torr (= 1 mm Hg) $= 1{,}333 \times 10^2$ Pa

1 atmosfære $= 1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 bar $= 10^5$ Pa

SI-enheden for temperatur er kelvin (K).

Gaskonstanten R er 8,314 $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$.

Damptrykkets afhængighed af temperaturen beskrives ved Clausius-Clapeyron's ligning:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + \text{konstant}$$

hvor:

p = stoffets damptryk i pascal

ΔH_v = stoffets fordampningsvarme i $J \cdot mol^{-1}$

R = gaskonstanten i $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$

T = den absolutte temperatur i K

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. TESTMETODERNES PRINCIP

Der foreslås syv metoder til bestemmelse af damptryk, som hver kan bruges i forskellige damptryksintervaller. Ved hver metode bestemmes damptrykket ved flere forskellige temperaturer. I et begrænset temperaturinterval er logaritmen til damptrykket af et rent stof en lineær funktion af den reciprokke værdi af temperaturen.

1.4.1. **Dynamisk metode**

Ved den dynamiske metode måles den kogetemperatur, der svarer til et specificeret tryk.

Anbefalet område:

10^3 til 10^5 Pa.

Denne metode anbefales også til bestemmelse af kogepunkt og kan anvendes til dette formål op til 600 K.

1.4.2. **Statisk metode**

Ved den statiske metode bestemmes damptrykket i et lukket system, der er i termodynamisk ligevægt ved en specificeret temperatur. Metoden er egnet til faste stoffer og væsker, som består af en eller flere komponenter.

Anbefalet område:

10 til 10^5 Pa. Med den fornødne omhu kan metoden også anvendes i området fra 1 til 10 Pa.

1.4.3. **Isoteniskop**

Denne standardiserede metode er også en statisk metode, men den kan normalt ikke anvendes til flerkomponentsystemer. Der kan søges yderligere oplysninger i ASTM D 2879-86.

Anbefalet område:

100 til 10^5 Pa.

1.4.4. **Effusionsmetode: damptryksvægt**

Den stofmængde, der forlader en celle pr. tidsenhed gennem en åbning af kendt størrelse, bestemmes under vakuum, så den mængde stof, der vender tilbage til cellen, er ubetydelig (f.eks. ved måling af den impuls, en dampstråle udøver på en følsom vægt, eller ved måling af vægttabet).

Anbefalet område:

10^{-3} til 1 Pa.

1.4.5. **Effusionsmetode: vægttab eller opfangning af damp**

Metoden er baseret på bestemmelse af den mængde teststof, der under ultravakuum strømmer ud af en Knudsen-celle (4) gennem en mikroåbning pr. tidsenhed i gasform. Massen af den udsivede damp kan konstateres enten ved at bestemme cellens vægttab eller ved at kondensere dampen ved lav temperatur og bestemme den fordampede mængde stof ved kromatografisk analyse. Damptrykket beregnes ved anvendelse af Hertz-Knudsen-relationen.

Anbefalet område:

10^{-3} til 1 Pa.

1.4.6. **Gasmætningsmetode**

Der ledes en strøm af inaktiv bæregas hen over stoffet på en sådan måde, at den mættes med dampen. Den stofmængde, en kendt bæregasmængde transporterer, kan enten måles ved opsamling i en passende fælde eller ved in-line analyse. Herudfra kan damptrykket ved en given temperatur beregnes.

Anbefalet område:

10^{-4} til 1 Pa. Med den fornødne omhu kan metoden også anvendes i området fra 1 til 10 Pa.

1.4.7. **Roterende kugle**

I denne metode er det egentlige måleorgan en lille stålkugle, der svæver i et magnetfelt og roterer med høj hastighed. Gastrykket udledes af den trykafhængige bremsning af stålkuglen.

Anbefalet område:

10^{-4} til 0,5 Pa.

1.5. KVALITETSKRITERIER

I følgende tabel er de forskellige metoder til bestemmelse af damptryk sammenlignet med hensyn til anvendelse, repeterbarhed, reproducerbarhed, måleområde og foreliggende standard.

TABEL: KVALITETSKRITERIER

Målemetode	Stoffer		Skønnet repeterbarhed (1)	Skønnet reproducerbarhed (1)	Anbefalet område	Foreliggende standard
	faste	væsker				
1.4.1. Dynamisk metode	lavtsmeltende	ja	op til 25%	op til 25%	10^3 Pa til 2×10^3 Pa	—
			1 til 5%	1 til 5%	2×10^3 Pa til 10^5 Pa	—
1.4.2. Statisk metode	ja	ja	5 til 10%	5 til 10%	10 Pa til 10^5 Pa (2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Isoteniskop	ja	ja	5 til 10%	5 til 10%	10^2 Pa til 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Effusionsmetode: damptryksvægt	ja	ja	5 til 20%	op til 50%	10^{-3} Pa til 1 Pa	NFT 20 – 047 (6)
1.4.5. Effusionsmetode: vægttab	ja	ja	10 til 30%	—	10^{-3} Pa til 1 Pa	—
1.4.6. Gasmætningsmetode	ja	ja	10 til 30%	op til 50%	10^{-4} Pa til 1 Pa (2)	—
1.4.7. Roterende kugle			10 til 20%	—	10^{-4} Pa til 0,5 Pa	—

(1) Afhængigt af renhedsgraden.
(2) Med den fornødne omhu kan disse metoder også anvendes i området fra 1 til 10 Pa.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

1.6.1. Dynamisk måling

1.6.1.1. *Apparatur*

Måleinstrumentet består typisk af en kogebeholder med tilsluttet køler fremstillet af glas eller metal (figur 1), udstyr til måling af temperaturen og udstyr til regulering og måling af trykket. Et typisk måleudstyr som det på skitsen viste er fremstillet af varmebestandigt glas og består af fem dele:

Et stort delvis dobbeltvægget rør bestående af en slibsamling, en køler, en kølebeholder og et indløb.

Der er monteret en glascylinder med en Cottrell-pumpe på rørets kogesektion, og dens overflade er ru, så stødkogning undgås.

Temperaturen måles med en egnet temperaturføler (f.eks. modstandstermometer eller termoelement med kappe), som er ført ind i instrumentet helt til målepunktet (figur 1, nr. 5) gennem en passende åbning (f.eks. udvendigt slib).

Der foretages de fornødne tilslutninger til det udstyr, hvormed trykket reguleres og måles.

Bulben, der fungerer som stødpudevolumen, er forbundet med måleinstrumentet med et kapillarrør.

Kogebeholderen opvarmes med et varmeelement (f.eks. varmepatron), der er indført i glasapparaturet nedefra. Den nødvendige strømstyrke indstilles og reguleres via et termoelement.

Det påkrævede vakuum på mellem 10^2 og ca. 10^5 Pa skabes med en vakuumpumpe.

Der benyttes en passende ventil til regulering af trykket med luft eller nitrogen (måleområde ca. 10^2 til 10^5 Pa) og til udluftning.

Trykket måles med et manometer.

1.6.1.2. *Fremgangsmåde ved målingen*

Damptrykket måles ved, at prøvens kogepunkt bestemmes ved forskellige specificerede tryk mellem ca. 10^3 og 10^5 Pa. En ikke-stigende temperatur ved konstant tryk viser, at kogetemperaturen er nået. Skummende stoffers damptryk kan ikke måles ved denne metode.

Stoffet anbringes i testkammeret, der skal være rent og tørt. Det kan være vanskeligt med ikke-pulverformige faste stoffer, men det kan undertiden hjælpe at opvarme kølekappen. Når kammeret er fyldt, samles apparatet, og stoffet afgasses. Derpå indstilles der på det laveste ønskede tryk, og der tændes for opvarmningen. Samtidig tilsluttes temperaturføleren til en skriver.

Der er nået ligevægt, når der registreres konstant kogetemperatur ved konstant tryk. Det skal nøje påses, at der ikke forekommer stødkogning. Desuden skal der ske fuldstændig kondensation på svaleren. Ved bestemmelse af damptryk af lavtsmeltende faste stoffer, skal man omhyggeligt sørge for, at svaleren ikke tilstoppes.

Når ligevægtspunktet er registreret, indstilles der til et højere tryk. Der fortsættes på samme måde, indtil 10^5 Pa er nået (ca. 5 til 10 målepunkter i alt). Som kontrol gentages ligevægtspunkterne ved aftagende tryk.

1.6.2. Statisk måling

1.6.2.1. *Apparatur*

Apparaturet består af en beholder til prøven og et opvarmnings- og afkølingssystem til regulering og måling af prøvens temperatur. Apparaturet omfatter desuden instrumenter til indstilling og måling af trykket. Figur 2a og 2b viser grundprincipperne.

Testkammeret (figur 2a) er på den ene side afgrænset af en passende højvakuumventil og på den anden side forbundet med et U-rør, der indeholder en egnet manometervæske. Den anden ende af U-røret er tilsluttet til vakuumpumpen, nitrogenflasken eller udluftningsventilen og et manometer.

I stedet for U-røret kan der anvendes en trykmåler med separat viser (figur 2b).

Prøvens temperatur styres ved, at testkammeret med ventil og U-rør eller trykmåler anbringes i et bad, der holdes ved konstant temperatur ± 0,2 K. Temperaturmålingerne udføres på ydersiden af testkammerets væg eller i selve testkammeret.

Der benyttes en vakuumpumpe med frysefælde til evakuering af apparatet.

I metode 2a måles stoffets damptryk indirekte ved hjælp af en nulindikator. Der tages derved hensyn til, at massefylden af væsken i U-røret ændrer sig, hvis der sker store temperaturændringer.

Følgende væsker er egnede som nulindikatorer i U-røret og vælges under hensyntagen til trykområdet og teststoffets kemiske egenskaber: siliconevæsker og phthalater. Teststoffet må ikke kunne opløses væsentligt i eller reageres med U-rørvæsken.

I manometre kan der bruges kviksølv i området fra normalt lufttryk til 10^2 Pa, mens siliconevæsker og phthalater er egnede fra 10^2 ned til 10 Pa. Varmebestandige membrankondensatormanometre kan endda benyttes under 10^{-1} Pa. Der findes også andre trykmålere, der kan bruges under 10^2 Pa.

1.6.2.2. *Fremgangsmåde ved målingen*

Før målingen skal alle dele af det i figur 2 viste apparat rengøres og tørres omhyggeligt.

Ved metode 2a fyldes U-røret med den valgte væske, der afgasses ved høj temperatur, inden der foretages aflæsninger.

Teststoffet anbringes i apparatet, som samles, hvorefter temperaturen sænkes tilstrækkeligt til afgasning. Temperaturen skal være så lav, at luften suges ud, men der må ikke for flerkomponentsystemers vedkommende ske nogen ændring af materialets sammensætning. Om nødvendigt kan indstillingen af ligevægt fremskyndes ved omrøring.

Prøven kan underafkøles med f.eks. flydende nitrogen (pas på kondensation i luften og pumpevæsken) eller en blanding af ethanol og tøris. Til lavtemperaturmålinger benyttes et temperaturreguleret bad forbundet med en ultrakryomat.

Idet ventilen over testbeholderen står åben, suges der i flere minutter, så luften fjernes. Derefter lukkes ventilen, og prøvens temperatur sænkes til den laveste ønskede. Om nødvendigt gentages afgasningen flere gange.

Når prøven opvarmes, stiger damptrykket, hvorved væsken i U-røret ændrer ligevægtsstilling. Som kompensation ledes der nitrogen eller luft ind i apparatet via ventilen, indtil trykindikatorvæsken atter er på nul. Det tilsvarende tryk kan aflæses på et præcisionsmanometer ved stuetemperatur. Dette tryk svarer til stoffets damptryk ved den pågældende måletemperatur.

Metode 2b er en lignende metode, men damptrykket aflæses direkte.

Damptrykkets temperaturafhængighed bestemmes med passende små intervaller (ca. 5 til 10 målepunkter) op til det ønskede maksimum. Som kontrol gentages lavtemperaturmålingerne.

En eventuel afvigelse mellem de nye målinger og den kurve, der er fundet ved stigende temperatur, kan skyldes

1. at prøven stadig indeholder luft (f.eks. meget tyktflydende materialer) eller lavtkogende stoffer, som er frigjort under opvarmningen og kan fjernes ved sugning efterfulgt af endnu en underafkøling

2. at afkølingstemperaturen ikke er lav nok. I så fald benyttes der flydende nitrogen som kølemiddel

   I tilfælde 1 og 2 må målingerne gentages.

3. at der sker en kemisk reaktion i stoffet i det undersøgte temperaturinterval (f.eks. dekomponering eller polymerisering).

1.6.3. Isoteniskop

Reference 7 indeholder en fuldstændig beskrivelse af denne metode. Måleanordningens princip fremgår af figur 3. Isoteniskopet er i lighed med den under 1.6.2 beskrevne metode egnet til undersøgelse af såvel faste stoffer som væsker.

Ved måling på væsker, tjener stoffet selv som hjælpemanometervæske. Der anbringes en sådan mængde af stoffet i isoteniskopet, at kuglen og den korte arm af manometersektionen er fyldt. Isoteniskopet forbindes med et vakuumsystem, evakueres og fyldes med nitrogen. Evakueringen og rensningen af systemet gentages to gange, så alt resterende oxygen fjernes. Det fyldte isoteniskop anbringes vandret, så prøven fordeler sig i et tyndt lag i kuglen og manometersektionen (U-delen). Trykket i systemet reduceres til 133 Pa, og prøven opvarmes forsigtigt, indtil den netop koger (fjernelse af opløste fikserede gasser). Isoteniskopet anbringes nu således, at prøven atter befinder sig i kuglen og manometerets korte arm og begge er helt fyldt med væske. Der opretholdes samme tryk som ved afgasning; kuglens udtrukne spids opvarmes med en lille flamme, indtil den dannede damp udvider sig tilstrækkeligt til, at en del af prøven presses ud af kuglens øvre del og manometerarm og ud i isoteniskopets manometersektion, hvorved der opstår et dampfyldt nitrogenfrit rum.

Isoteniskopet anbringes dernæst i et bad med konstant temperatur, og nitrogentrykket indstilles til det er lig med prøvens tryk. At der er trykligevægt fremgår af isoteniskopets manometersektion. Ved ligevægt er nitrogenens damptryk lig med stoffets damptryk.

Ved måling på faste stoffer benyttes en af de i 1.6.2.1 nævnte manometervæsker, alt efter tryk- og temperaturområde. Der fyldes afgasset manometervæske ind i en udvidelse på isoteniskopets lange arm. Derefter anbringes det faste teststof i kuglen og afgasses ved høj temperatur. Dernæst hældes isoteniskopet således, at manometervæsken kan strømme ind i U-røret. Måling af damptrykket som funktion af temperaturen foregår som under 1.6.2.

1.6.4. Effusionsmetoden: damptryksvægt

1.6.4.1. *Apparatur*

I litteraturen (1) er der beskrevet forskellige versioner af apparaturet. Det her beskrevne apparatur illustrerer det generelle princip (figur 4). Figur 4 viser apparaturets hovedkomponenter: en højvakuumbeholder af glas eller rustfrit stål, udstyr til generering og måling af vakuum og indbyggede komponenter til måling af damptryk på en vægt. Apparaturet indeholder følgende indbyggede komponenter:

— en fordampningsovn med flange og drejelig gennemføring. Fordampningsovnen er en cylindrisk beholder fremstillet i f.eks. kobber eller en godt varmeledende kemisk bestandig legering. Der kan også benyttes en glasbeholder med kobbervæg. Ovnen har en diameter på ca. 3 til 5 cm og en højde på 2 til 5 cm. Der er 1 til

3 åbninger af forskellig størrelse til dampstrømmen. Ovnen opvarmes enten med en varmeplade underneden eller med en varmespiral omkring ydersiden. For at undgå bortledning af varme til grundpladen er varmeaggregatet fastgjort hertil med et metal med ringe varmeledningsevne (nikkel/sølv eller chromnikkelstål), f.eks. et nikkel/sølv-rør fastgjort til en drejelig gennemføring, hvis der benyttes en ovn med flere åbninger. En sådan opstilling har den fordel, at der kan indstikkes en kobberstang, så der kan køles udefra med et kuldebad

— hvis der i ovnens kobberlåg er tre åbninger anbragt med 90° i forhold til hinanden, kan forskellige damptryksintervaller inden for det totale måleområde dækkes (åbninger med diameter mellem ca. 0,30 og 4,50 mm). De store åbninger benyttes til lave damptryk og omvendt. Ved drejning af ovnen kan den ønskede åbning eller en mellemstilling i dampstrømmen (ovnåbning — skærm — vægtskål) indstilles, så molekylestrømmen frigøres eller afbøjes af ovnåbningen og rammer vægtskålen. Stoffets temperatur måles med et termoelement eller et modstandstermometer anbragt et passende sted

— over skærmen befinder sig vægtskålen på en meget følsom mikrovægt (se nedenfor). Vægtskålen er ca. 30 mm i diameter. Forgyldt aluminium er et egnet materiale

— vægtskålen er omgivet af en cylindrisk kølekappe af messing eller kobber. Afhængigt af vægttypen er den forsynet med åbninger for vægtbjælken og en skærmåbning til molekylestrømmen, og den skal garantere fuldstændig kondensering af dampen på vægtskålen. Varmen bortledes til omgivelserne f.eks. med en kobberstang, der er forbundet med kølekappen. Denne stang er ført gennem grundpladen og isoleret herfra, f.eks. med et rør af chromnikkelstål. Den nedsænkes i et dewarkar med flydende nitrogen under grundpladen, eller der ledes flydende nitrogen gennem stangen. Herved holdes kølekappen på en temperatur på ca. – 120 °C. Vægtskålen køles udelukkende ved stråling, hvilket er tilfredsstillende i det pågældende trykinterval (afkøling ca. 1 time før målingerne påbegyndes)

— vægten er anbragt over kølekappen. En højfølsom toarmet elektronisk mikrovægt (8) eller et meget følsomt drejespoleinstrument (se OECD Test Guideline 104, udgave af 12.5.1981) er eksempler på egnede vægte

— på grundpladen findes ligeledes de elektriske tilslutninger for termoelementer (eller modstandstermometre) og varmelegemer

— der frembringes et vakuum i beholderen med enten en partiel vakuumpumpe eller en højvakuumpumpe (der kræves et vakuum på ca. 1 til 2×10^{-3} Pa, hvilket opnås efter 2 timers pumpning). Trykket reguleres med et egnet ioniseringsmanometer.

1.6.4.2. *Fremgangsmåde ved målingen*

Teststoffet fyldes i beholderen, som lukkes med låget. Skærmen og kølekappen skubbes på plads over ovnen. Apparatet lukkes, og vakuumpumperne startes. Sluttrykket skal være ca. 10^{-4} Pa, før målingerne påbegyndes. Afkøling af kølekappen sættes i gang ved 10^{-2} Pa.

Når det krævede vakuum er nået, startes kalibreringsrækken ved den laveste temperatur. Der indstilles på den pågældende åbning i låget, og dampstrømmen passerer gennem skærmen direkte over åbningen og rammer den afkølede vægtskål. Vægtskålen skal være så stor, at hele den dampstrøm, der ledes gennem skærmen, rammer den. Dampstrømmens impuls overfører en kraft til vægtskålen, og molekylerne kondenserer på dens kolde overflade.

Impulsen og den samtidige kondensation frembringer et signal på skriveren. Ved vurdering af signalerne kan der uddrages to oplysninger:

1. Med det her beskrevne apparatur bestemmes damptrykket direkte ud fra den impuls, der overføres til vægtskålen (hertil er det ikke nødvendigt at kende molekylvægten (6)). Ved vurdering af aflæsningerne må der tages hensyn til geometriske faktorer, såsom ovnåbningen og molekylestrømmens vinkel.

2. Kondensatets masse kan måles samtidig, og herudfra kan fordampningshastigheden beregnes. Endvidere kan damptrykket beregnes ud fra fordampningshastigheden og molekylvægten ved hjælp af Hertz's ligning (2).

$$p = G \sqrt{\frac{2 \pi RT \times 10^3}{M}}$$

hvor

G = fordampningshastigheden (kg $s^{-1}m^{-2}$)

M = molekylmassen (g mol^{-1})

T = temperaturen (K)

R = gaskonstanten (J mol^{-1} K^{-1})

p = damptrykket (Pa).

Når det ønskede vakuum er nået, påbegyndes måleserien ved den laveste ønskede måletemperatur.

Videre målinger foretages ved, at temperaturen hæves i små spring, indtil den højeste ønskede temperatur er nået. Dernæst afkøles prøven igen, og der optegnes endnu en kurve over damptrykket. Bekræfter de sidste resultater ikke de første, kan det skyldes, at stoffet dekomponerer i det undersøgte temperaturområde.

1.6.5. Effusionsmetode — vægttab

1.6.5.1. *Apparatur*

Et effusionsapparat består af følgende basiskomponenter:

— en beholder, der kan termostateres og evakueres, og hvori effusionscellerne placeres

— en højvakuumpumpe (f.eks. diffusionspumpe eller turbomolekylarpumpe) med vakuummeter

— en frysefælde med flydende nitrogen eller tøris.

Som eksempel er der i figur 5 vist en elektrisk opvarmet vakuumbeholder af aluminium med fire effusionsceller af rustfrit stål. Den rustfrie stålfolie af ca. 0,3 mm's tykkelse har en effusionsåbning på 0,2 til 1,0 mm i diameter og er fastgjort til effusionscellen med et låg med gevind.

1.6.5.2. *Fremgangsmåde ved målingen*

Referencestoffet og teststoffet fyldes i hver effusionscelle, metalmembranen med åbningen fastgøres ved hjælp af låget med gevind, og hver celle vejes med en nøjagtighed på 0,1 mg. Cellen anbringes i det termostaterede apparat, som derefter evakueres til et tryk, der er mindre end en tiendedel af det forventede. Med på forhånd fastsatte tidsintervaller på mellem 5 og 30 timer lukkes der luft ind i apparatet, og effusionscellernes massetab bestemmes ved vejning.

For at sikre at resultaterne ikke påvirkes af flygtige bestanddele, vejes cellen med faste mellemrum, så det kan kontrolleres, at fordampningshastigheden er konstant over mindst to tidsintervaller.

Damptrykket p i effusionscellen er givet ved:

$$p = \frac{m}{KAt}\sqrt{\frac{2\pi R T}{M}}$$

hvor

p = damptrykket (Pa)

m = massen af den stofmængde, der forlader cellen i tidsrummet t (kg)

t = tiden (s)

A = hullets areal (m^2)

K = korrektionsfaktor

R = gaskonstanten (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperaturen (K)

M = molekylmassen (kg mol^{-1}).

Korrektionsfaktoren K afhænger af forholdet mellem den cylindriske åbnings længde og radius:

forhold:	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K:	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

Ovenstående ligning kan omskrives til:

$$p = E \frac{m}{t} \sqrt{\frac{T}{M}}$$

hvor $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2 \pi R}$ er effusionscellekonstanten.

Denne effusionscellekonstant kan bestemmes ved hjælp af referencestoffer (2,9) ud fra følgende ligning:

$$E = \frac{p(r)\, t}{m} \sqrt{\frac{M(r)}{T}}$$

hvor

p(r) = referencestoffets damptryk (Pa)

M(r) = referencestoffets molekylmasse (kg mol^{-1})

1.6.6. Gasmætningsmetode

1.6.6.1. *Apparatur*

Et typisk apparat til udførelse af denne prøvning består af de komponenter, der er vist i figur 6a og beskrevet nedenfor (1).

Inert gas:

Bæregassen må ikke reagere kemisk med teststoffet. Det er normalt tilstrækkeligt at anvende nitrogen til dette formål, men undertiden kan der kræves andre gasser (10). Den anvendte gas skal være tør (se figur 6a, nr. 4 : føler for relativ fugtighed).

Strømningsregulering:

Der kræves et velegnet gasreguleringssystem for at sikre konstant og valgbar gennemstrømningshastighed gennem mætningskolonnen.

Fælder til opsamling af damp:

Disse afhænger af den aktuelle prøves egenskaber og af den valgte analysemetode. Dampen skal indfanges kvantitativt og i en form, som tillader efterfølgende analyse. Til visse stoffer vil fælder, der indeholder væsker såsom hexan eller ethylenglycol, være velegnede. Til andre vil der kunne anvendes faste absorptionsmidler.

Som alternativ til opsamling af damp og efterfølgende analyse kan der benyttes in-line analyseteknikker, som f.eks. chromatografi, til kvantitativ bestemmelse af den mængde materiale, som en kendt mængde bæregas fører med sig. Desuden kan prøvens massetab måles.

Varmeveksler:

Til målinger ved forskellige temperaturer kan det være nødvendigt at indsætte en varmeveksler i opstillingen.

Mætningskolonne:

Teststoffet overføres til en egnet inaktiv bærer fra en opløsning. Den coatede bærer pakkes i mætningskolonnen; dennes dimensioner og gennemstrømningshastigheden skal afpasses således, at man er sikker på, at bæregassen bliver mættet. Mætningskolonnen skal være termostateret. Ved målinger over stuetemperatur skal stykket mellem mætningskolonnen og fælderne opvarmes, så kondensation af teststoffet undgås.

For at mindske massetransport ved diffusion kan der anbringes et kapillarrør efter mætningskolonnen (figur 6b).

1.6.6.2. *Fremgangsmåde ved målingen*

Klargøring af mætningskolonnen:

En opløsning af teststoffet i et meget letflygtigt opløsningsmiddel blandes med en passende mængde af bæreren. Der skal være tilstrækkeligt med teststof til, at der finder mætning sted under hele testens varighed. Opløsningsmidlet afdampes fuldstændigt i luft eller i en rotationsfordamper, og efter omhyggelig blanding fyldes materialet på mætningskolonnen. Efter at prøven er termostateret, ledes der tør nitrogen gennem apparatet.

Måling:

Fælderne eller in-line detektoren forbindes med kolonnens afgangsrør, og tiden registreres. Gennemstrømningshastigheden kontrolleres i begyndelsen og med regelmæssige mellemrum under forsøget ved anvendelse af en boblemåler (eller kontinuerligt med en massestrømsmåler).

Trykket ved mætningskolonnens afgangsåbning skal måles. Dette kan ske ved

a) enten at indsætte en trykmåler mellem mætningskolonnen og fælderne (hvilket kan være utilfredsstillende på grund af øget dødvolumen og større adsorptionsflade)

b) eller at bestemme trykfaldet over det bestemte fældesystem, der benyttes, som funktion af gennemstrømningshastigheden i et særskilt forsøg (hvilket kan være lidet tilfredsstillende for væskefælder).

Den tid, der kræves til opsamling af den mængde teststof, der er nødvendig til de forskellige analysemetoder, bestemmes ved forforsøg eller skønnes. Som alternativ til opsamling af stoffet til senere analyse kan der benyttes kvantitative in-line analyseteknikker (f.eks. chromatografi). Før beregning af damptrykket ved en given temperatur udføres der forforsøg til bestemmelse af den maksimale flowhastighed, hvor bæregassen mættes fuldstændigt med stofdampe. Dette sikres ved at lede bæregassen så langsomt gennem mætningskolonnen, at en lavere hastighed ikke giver større beregnet damptryk.

Den specifikke analysemetode vil afhænge af arten af teststof, der undersøges (f.eks. gaschromatografi eller gravimetri).

Den mængde stof, som et kendt rumfang bæregas fører med sig, bestemmes.

1.6.6.3. *Beregning af damptryk*

Damptrykket beregnes ud fra dampens massefylde W/V ved hjælp af ligningen:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

hvor

p = damptrykket (Pa)

W = massen af den stofmængde, der er fordampet (g)

V = rumfang mættet gas (m^3)

R = gaskonstanten ($Jmol^{-1} K^{-1}$)

T = temperaturen (K)

M = teststoffets molekylmasse ($g\ mol^{-1}$).

De målte rumfang skal korrigeres for temperaturforskelle mellem flowmeteret og den termostaterede mætningskolonne. Hvis flowmeteret er placeret efter dampfælden, kan det være nødvendigt at korrigere for eventuelt fordampede bestanddele fra fælden (1).

1.6.7. **Roterende kugle (8, 11, 13)**

1.6.7.1. *Apparatur*

Metoden kan udføres ved hjælp af en viskositetsmåler med roterende kugle som vist på figur 8. Figur 7 viser forsøgsopstillingen skematisk.

Måleopstillingen består typisk af et målehoved med roterende kugle anbragt i et termostateret hus (kontrolleret inden for 0,1 °C). Testbeholderen er ligeledes anbragt i et termostateret hus (kontrolleret inden for 0,01 °C), og alle opstillingens komponenter holdes ved en højere temperatur for at undgå kondensation. Systemet er ved hjælp af højvakuumventiler forbundet med en højvakuumpumpe.

Målehovedet består af en stålkugle (4 til 5 mm diameter) i et rør. Kuglen holdes stabilt svævende af et magnetfelt, sædvanligvis ved en kombination af permanentmagneter og styrespoler.

Kuglen sættes i rotation ved hjælp af roterende felter, der frembringes af spolerne. Rotationshastigheden måles med detektorspoler, der måler den svage tværmagnetisering af kuglen, der altid vil være til stede.

1.6.7.2. *Fremgangsmåde ved målingen*

Når kuglen har opnået en bestemt rotationshastighed v(o) (normalt omkring 400 omdrejninger pr. sekund), afbrydes energitilførslen, og gasfriktionen begynder at decelerere kuglens rotation.

Rotationshastighedstabet måles som funktion af tiden. Da friktionen i det magnetiske ophæng er ubetydelig sammenlignet med gasfriktionen, er gastrykket givet ved udtrykket

$$p = \frac{\pi \bar{c} r \rho}{\sigma 10 t} \times \ln \frac{v(t)}{v(o)}$$

hvor

$\bar{c}$ = gasmolekylernes gennemsnitshastighed

r = kuglens radius

ρ = kuglens massefylde

σ = koefficient for tangential impulsoverførsel (σ = 1 for en ideal kugleflade)

t = tiden

v(t) = rotationshastigheden efter tiden t

v(o) = begyndelsesrotationshastigheden.

Dette udtryk kan også omskrives til:

$$p = \frac{\pi \bar{c} r \rho}{10 \sigma} \times \frac{t_n - t_{n-1}}{t_n \times t_{n-1}}$$

hvor t_n og t_{n-1} er den tid, der kræves til et givet antal omdrejninger N. Disse tidsintervaller t_n og t_{n-1} følger lige efter hinanden, og $t_n > t_{n-1}$.

Gasmolekylernes gennemsnitshastighed Ec er givet ved

$$\bar{c} = \left(\frac{8 RT}{\pi M} \right)^{\frac{1}{2}}$$

hvor

T = temperaturen

R = gaskonstanten

M = molekylmassen

2. DATA

Damptrykket bestemt ved en hvilken som helst af de ovenfor beskrevne metoder bør bestemmes ved mindst to temperaturer. Tre eller flere er ønskelige i området 0 °C til 50 °C, så damptrykkurvens linearitet kan kontrolleres.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder) og eventuel indledende rensning

— mindst to værdier for damptryk og temperatur, helst i området mellem 0 °C og 50 °C

— alle rådata

— en afbildning af log p mod 1/T

— et skøn over damptrykket ved 20 eller 25 °C.

Hvis der er iagttaget omdannelse (ændring i tilstandsform eller dekomponering), skal følgende oplysninger fremgå:

— ændringens art

— den temperatur, hvor ændringen sker ved atmosfæretryk

— damptrykket ved 10 og 20 °C under overgangstemperaturen og ved 10 og 20 °C over denne temperatur (medmindre overgangen er fra fast stof til gas).

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand, skal anføres.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Ambrose, D. in B. Le Neindre, B. Vodar, (Eds.): Experimental Thermodynamics, Butterworths, London, 1975, Vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Chapter IX, Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I.

(4) Knudsen, M. Ann. Phys. Lpz., 1909, vol. 29, 1979; 1911, vol. 34, 593.

(5) NF T 20-048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-1} to 10^{5} Pa — Static method.

(6) NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

(7) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(8) G. Messer, P. Rohl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, vol. 5 (4), 2440.

(9) Ambrose, D.; Lawrenson, I.J.; Sprake, C.H.S. J. Chem. Thermodynamics 1975, vol. 7, 1173.

(10) B.F. Rordorf. Thermochimica Acta, 1985, vol. 85, 435.

(11) G. Comsa, J.K. Fremerey and B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, vol. 17 (2), 642.

(12) G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, vol. 20 (4), 1148.

(13) J.K. Fremerey. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1985, vol. 3 (3), 1715.

Tillæg 1

Estimeringsmetode

INDLEDNING

Man kan benytte beregnede værdier for damptrykket til

— at beslutte, hvilken af forsøgsmetoderne der er egnet

— at foretage et skøn eller at fastsætte en grænseværdi, når man af tekniske årsager (herunder tilfælde, hvor damptrykket er meget lavt) ikke kan benytte eksperimentelle metoder

— at konstatere, i hvilke tilfælde det er berettiget at undlade eksperimentelle målinger, fordi damptrykket sandsynligvis vil være $< 10^{-5}$ Pa ved stuetemperatur.

ESTIMERINGSMETODE

Væskers og faste stoffers damptryk kan skønnes ved hjælp af den modificerede Watson-korrelation (a). Det eneste nødvendige eksperimentelle data er kogepunktet. Metoden kan benyttes i trykintervallet fra 10^{-5} Pa til 10^5 Pa.

I »Handbook of Chemical Property Estimation Methods« (b) findes der nærmere oplysninger om metoden.

FREMGANGSMÅDE VED BEREGNINGEN

Ifølge (b) beregnes damptrykket således:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b} \left[1 - \frac{(3 - 2\frac{T}{T_b})^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m (3 - 2\frac{T}{T_b})^{m-1} \ln\frac{T}{T_b} \right]$$

hvor

T = den pågældende temperatur

T_b = kogepunktet

P_{vp} = damptrykket ved temperaturen T

ΔH_{vb} = fordampningsvarmen

ΔZ_b = en sammentrykkelighedsfaktor (ansættes til 0,97)

m = en empirisk faktor, der afhænger af tilstandsformen ved den pågældende temperatur

Yderligere haves:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F (8{,}75 + R \ln T_b)$$

hvor K_F er en empirisk faktor, der tager hensyn til stoffets polaritet. I reference (b) er der en liste med K_F-faktorer for flere typer forbindelser.

Ofte forligger der data, hvor kogepunktet ved reduceret tryk er opgivet. I sådanne tilfælde kan man efter (b) beregne damptrykket således:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1} \left[1 - (3 - 2\frac{T}{T_1})^m \frac{T_1}{T} - 2m (3 - 2\frac{T}{T_1})^{m-1} \ln\frac{T}{T_1} \right]$$

hvor T_1 er kogepunktet ved det reducerede tryk P_1.

RAPPORT

Når estimeringsmetoden benyttes, skal rapporten indeholde fyldestgørende dokumentation af beregningen.

LITTERATUR

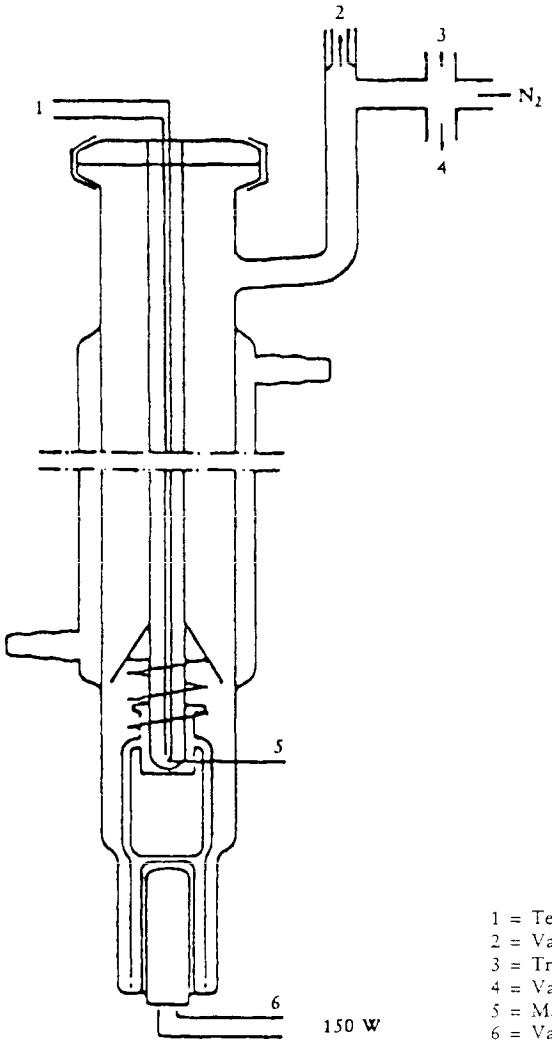
(a) K.M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, 398.

(b) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982.

Tillæg 2

Figur 1

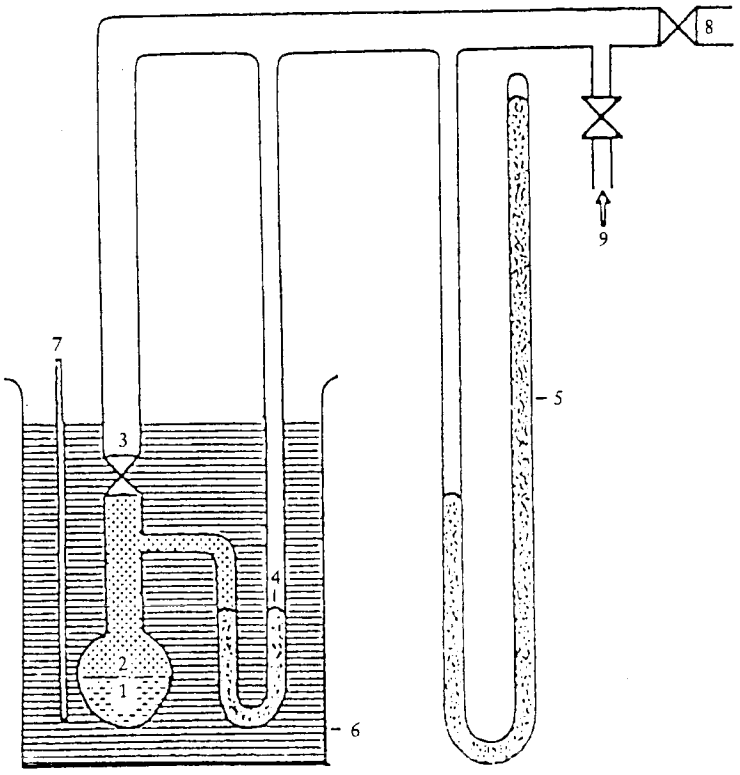
Apparat til bestemmelse af damptrykskurven efter den dynamiske metode



1 = Termoelement
2 = Vakuumstødpuderumfang
3 = Trykmåler
4 = Vakuum
5 = Målepunkt
6 = Varmeelement ca. 150 W

Figur 2a

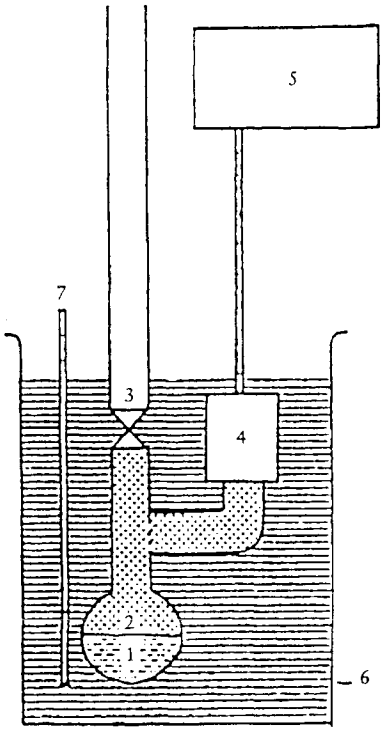
Apparat til bestemmelse af damptrykskurven efter den statiske metode (med U-rørsmanometer)



1. Teststof
2. Dampfase
3. Højvakuumventil
4. U-rør (hjælpemanometer)
5. Manometer
6. Temperaturbad
7. Temperaturmåleanordning
8. Til vakuumpumpe
9. Udluftning

Figur 2b

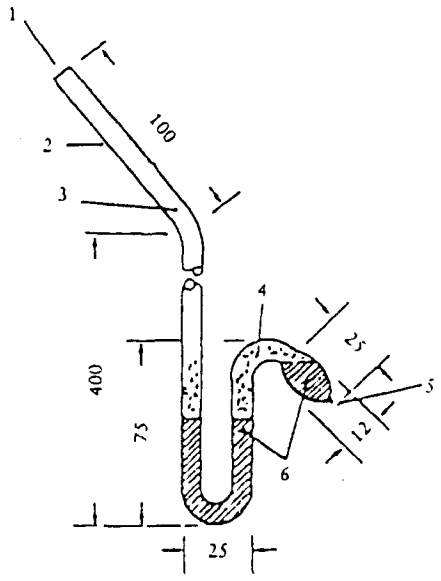
Apparat til bestemmelse af damptrykskurven efter den statiske metode (med trykindikator)



1. Teststof
2. Dampfase
3. Højvakuumventil
4. Trykmåler
5. Trykindikator
6. Temperaturbad
7. Temperaturmåleanordning

Figur 3

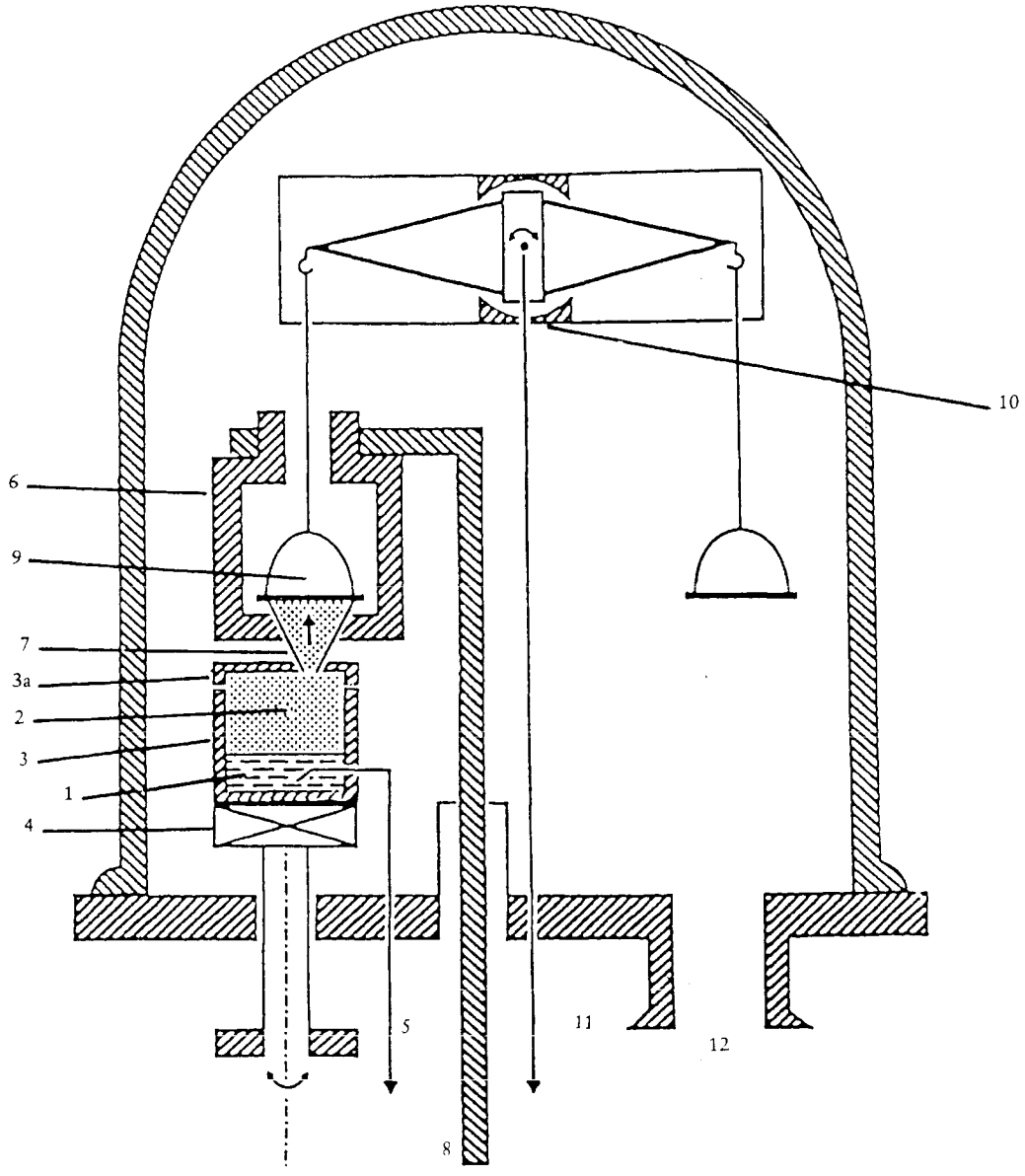
Isoteniskop (se reference 7)



1. Til system for trykregulering og -måling
2. Rør med ydre diameter 8 mm
3. Tør nitrogen i tryksystem
4. Dampe af prøven
5. Lille spids
6. Flydende prøve

Figur 4

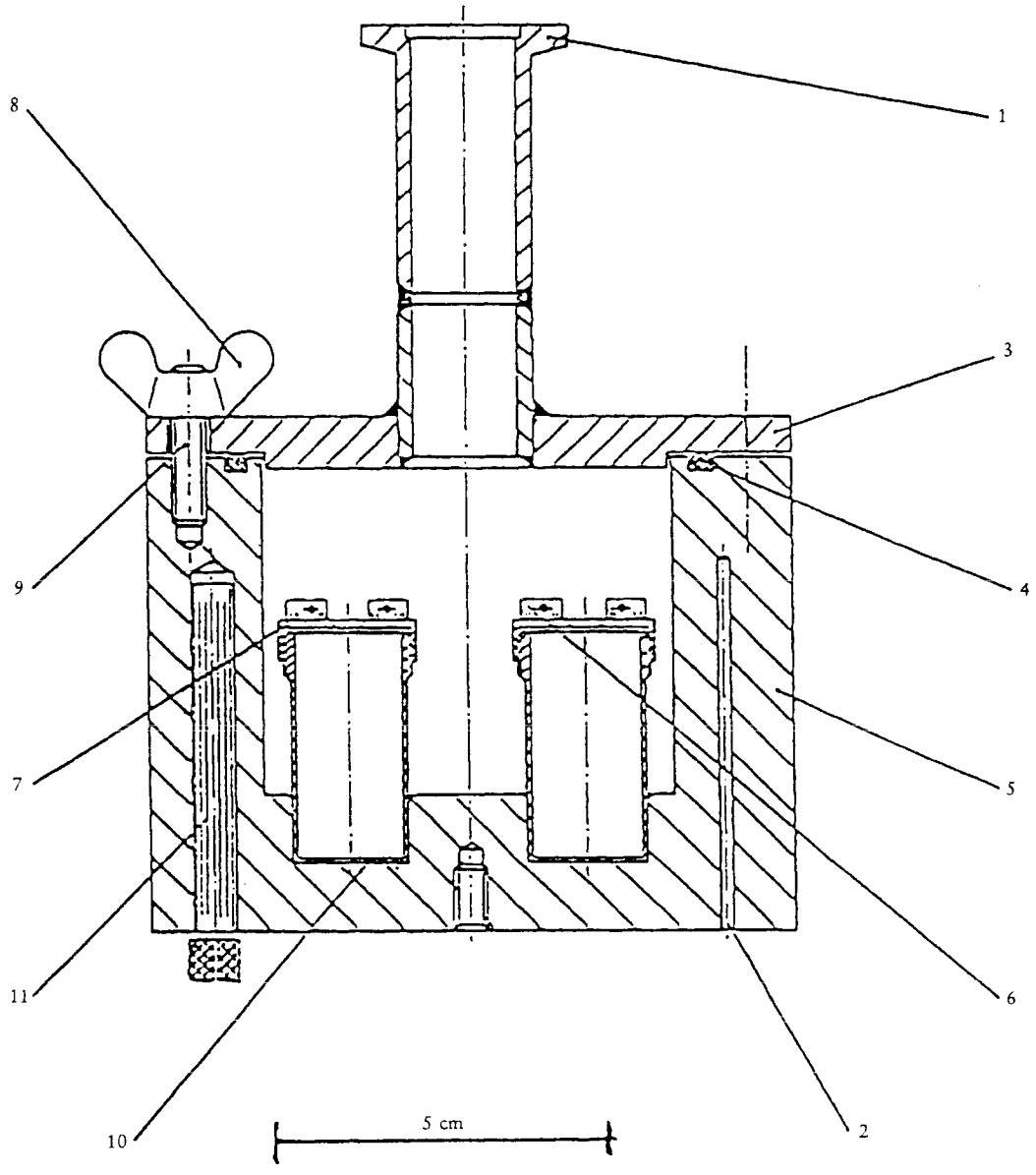
Apparat til bestemmelse af damptrykskurven efter metoden med damptryksvægt



1. Teststof
2. Dampfase med dampstrøm
3. Fordampningsovn med drejelig
3a. Ovnlåg med åbning
4. Opvarmning (afkøling) af ovn
5. Måling af prøvens temperatur
6. Kølekappe
7. Skærm
8. Kølestang til kølekappe gennemføring
9. Vægtskål
10. Mikrovægt
11. Til skriver
12. Til højvakuumpumpe

Figur 5

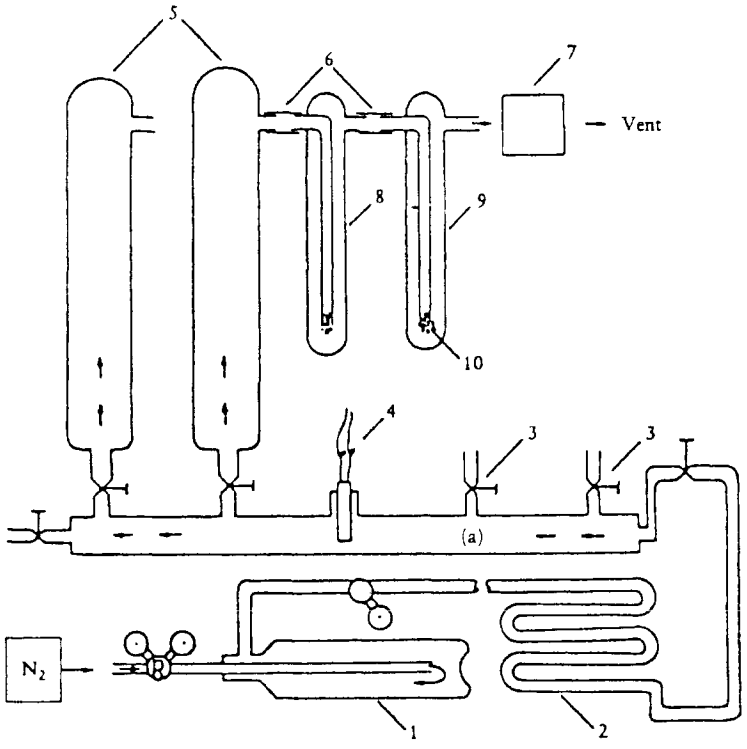
Eksempel på apparat til fordampning ved lavt tryk ved effusionsmetoden, med et effusionscellevolumen på 8 cm^3



1. Forbindelse til vakuum
2. Huller til platinmodstandstermometer eller temperaturmåling og -regulering (2)
3. Låg til vakuumbeholder
4. O-ring
5. Vakuumbeholder af aluminium
6. Anordning til anbringelse og fjernelse af effusionsceller
7. Låg med gevind
8. Vingemøtrikker (6)
9. Bolte (6)
10. Effusionsceller af rustfrit stål
11. Opvarmningspatroner (6)

Figur 6a

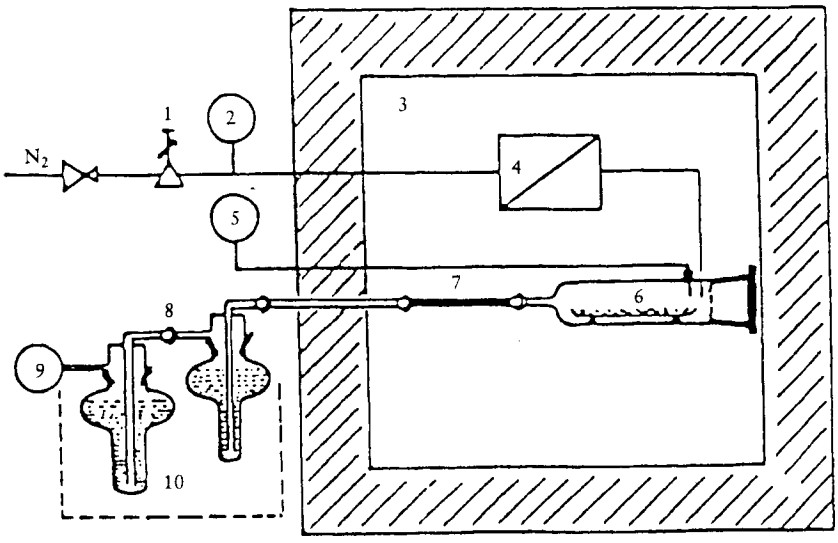
Eksempel på et strømningssystem til bestemmelse af damptryk efter gasmætningsmetoden



1 = Flowregulator
2 = Varmeveksler
3 = Nåleventiler
4 = Føler for relativ fugtighed
5 = Mætningskolonner
6 = PTFE-samlinger
7 = Flowmeter
8 = Fælde (absorber)
9 = Oliefælde
10 = Boblerør af glasfritte

Figur 6b

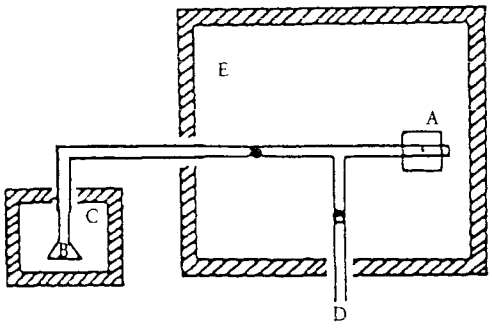
Eksempel på et system til bestemmelse af damptryk efter gasmætningsmetoden med kapillarrør anbragt efter mætningskammeret



1. Termisk masseflowmeter
2. Manometer
3. Kammer med temperaturstyring
4. Termostateringsspiral til bæregas
5. Termometer (Pt 100)
6. Gasmætningskammer
7. Kapillarrør
8. Absorptionsbeholdere
9. Gasmåler
10. Kuldefælde

Figur 7

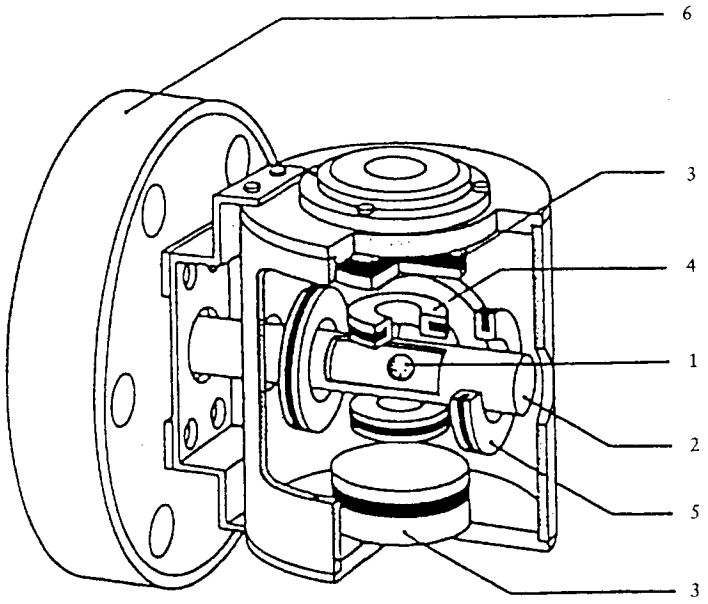
Eksempel på forsøgsopstilling til metoden med roterende kugle Damptryksapparat



A. Målehoved med roterende kugle
B. Prøvecelle;
C. Termostat
D. Vakuumrør (turbopumpe)
E. Lufttermostat

Figur 8

Eksempel på målehoved med roterende kugle



1. Kugle;
2. Evakueret rørformet forlængelse af 6;
3. Permanentmagneter (2);
4. Spoler (2) for vertikal stabilisering;
5. Drivspoler (4);
6. Tilslutningsflange.

A. 5. OVERFLADESPÆNDING

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i reference (2).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder anvendes til måling af vandige opløsningers overfladespænding.

Ved udførelsen af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets vandopløselighed, struktur, hydrolyseegenskaber og kritiske koncentrationer for micelledannelse.

De følgende metoder kan anvendes for de fleste kemiske stoffer uanset renheden.

Måling af overfladespænding ved ringtensiometermetoden er begrænset til vandige opløsninger med en dynamisk viskositet på mindre end ca. 200 mPa s.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den frie overfladeenthalpi pr. overfladearealenhed betegnes som overfladespændingen.

Overfladespændingen angives i:

N/m (SI-enhed)

eller mN/m (SI-underenhed)

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm i det gamle cgs-system.

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Referencestoffer, som dækker et bredt udvalg af overfladespændinger, er angivet i ref. 1 og 3.

1.4. METODERNES PRINCIP

Metoderne er baseret på måling af den største kraft, der skal udøves lodret på en stigbøjle eller ring i kontakt med væskeoverfladen af en prøve i et målekar for, at denne kontakt brydes, eller den lodrette kraft, som skal udøves på en plade, hvis ene kant er i kontakt med prøvens overflade, for at den dannede hinde brydes.

Stoffer, hvis opløselighed i vand er mindst 1 mg/l, testes i vandig opløsning ved én koncentration.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Disse metoder kan give større nøjagtighed, end der må forventes krævet ved miljøvurderinger.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Der fremstilles en opløsning af stoffet i destilleret vand. Koncentrationen af denne opløsning skal være 90% af stoffets mætningskoncentration i vand; er denne koncentration større end 1 g/l, benyttes der en koncentration på 1 g/l til testen. Stoffer med en opløselighed i vand på mindre end 1 mg/l behøver ikke at testes.

1.6.1. Plademetoden

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films).

1.6.2. Stigbøjlemetoden

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films).

1.6.3. Ringmetoden

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films).

1.6.4. OECD-harmoniseret ringmetode

1.6.4.1. *Apparatur*

Kommercielt tilgængelige tensiometre er tilstrækkelige til denne måling. De består af følgende dele:

— bevægeligt prøvebord

— kraftmålingssystem

— målelegeme (ring)

— målekar.

1.6.4.1.1. Bevægeligt prøvebord

Det bevægelige prøvebord anvendes til understøttelse af det termostaterede målekar, som rummer den væske, der skal undersøges. Sammen med kraftmålingssystemet er det monteret på et stativ.

1.6.4.1.2. Kraftmålingssystem

Kraftmålingssystemet (se figuren) er placeret over prøvebordet. Usikkerheden ved kraftmålingen må ikke overstige $\pm 10^{-6}$ N, svarende til en usikkerhed på ± 0,1 mg ved en vejning. Oftest er måleskalaen på de kommercielt tilgængelige tensiometre inddelt i mN/m, således at overfladespændingen direkte kan aflæses i mN/m med en nøjagtighed på 0,1 mN/m.

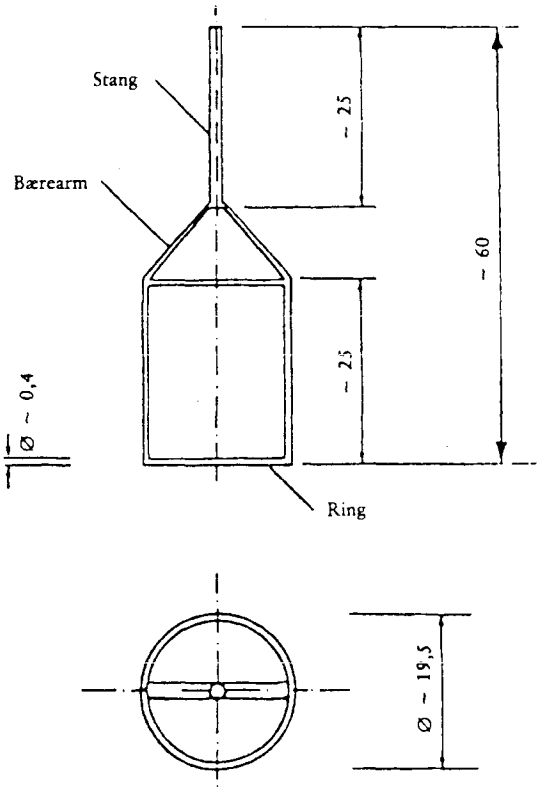
1.6.4.1.3. Målelegeme (ring)

Ringen er sædvanligvis fremstillet af en platin-iridium-tråd med en tykkelse på ca. 0,4 mm og en middelomkreds på 60 mm. Trådringen er ophængt vandret fra en metalstang og en trådbærearm, som danner forbindelsen til kraftmålingssystemet (se figuren).

Figur

Målelegeme

(alle dimensioner er i mm)



1.6.4.1.4. Målekar

Målekarret, som rummer testopløsningen, skal være et termostateret glaskar. Det skal have en sådan form, at temperaturen af testopløsningen og gasfasen herover er konstant under målingen, og at prøven ikke kan fordampe. Cylindriske glaskar med en indre diameter på mindst 45 mm er acceptable.

1.6.4.2. *Klargøring af apparatet*

1.6.4.2.1. Rengøring

Glaskar rengøres omhyggeligt. Om nødvendigt vaskes de først med varm chromsvovlsyre og dernæst med en tyktflydende phosphorsyreopløsning (83 til 98 w/w % H_3PO_4). Herefter skylles omhyggeligt i ledningsvand og endelig vaskes i redestilleret vand til neutral reaktion. Til sidst tørres karrene, eller de skylles i noget af den prøvevæske, som skal måles.

Ringen renses først grundigt i vand, så alle vandopløselige stoffer fjernes. Derefter nedsænkes den et øjeblik i chromsvovlsyre, skylles i redestilleret vand til neutral reaktion og opvarmes til sidst et øjeblik over en methanolflamme.

Bemærk:

Forurening med stoffer, som ikke opløses eller destrueres af chromsvovlsyre eller phosphorsyre, som f.eks. silikoner, fjernes ved hjælp af et passende organisk opløsningsmiddel.

1.6.4.2.2. Kalibrering af apparatet

Apparatet klargøres ved, at nulpunktet justeres, og apparatet indstilles til pålidelig aflæsning i mN/m.

Opstilling:

Apparatet skal stilles i vater, f.eks. ved hjælp af et vaterpas på tensiometrets fod, idet man justerer stilleskruerne.

Nulpunktsindstilling:

Efter montering af ringen i apparatet, men inden den nedsænkes i væsken, skal tensiometerviseren indstilles på nul, og man kontrollerer, at ringen er parallel med væskeoverfladen. Til dette kan væskeoverfladen anvendes som et spejl.

Kalibreringer:

Prøvekalibrermngen kan udføres ved en af de følgende to metoder:

a) ved hjælp af lodder: dette er en fremgangsmåde, hvor ryttere af kendt masse mellem 0,1 og 1,0 g anbringes på ringen. Kalibreringsfaktoren Φ_a, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

hvor:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = rytterens masse (g)

g = tyngdeaccelerationen (981 $cm \cdot s^{-2}$ ved havoverfladen)

b = ringens middelomkreds (cm)

σ_a = tensiometeraflæsningen efter anbringelse af rytteren på ringen (mN/m)

b) ved hjælp af vand: dette er en fremgangsmåde, hvor der anvendes rent vand, hvis overfladespænding ved f.eks. 23 °C er 72,3 mN/m. Denne fremgangsmåde er hurtigere at udføre end vægtkalibreringen, men der er altid risiko for, at vandets overfladespænding er ændret ved forurening med spor af overfladeaktive stoffer.

Kalibreringsfaktoren Φ_b, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (2):

$$\phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

hvor:

σ_o = litteraturværdi for vands overfladespænding (mN/m)

σ_g = målt værdi for vands overfladespænding (mN/m) ved samme temperatur.

1.6.4.3. *Testforberedelse*

Der fremstilles vandige opløsninger med passende koncentrationer af de stoffer, som skal undersøges. Opløsningerne må ikke indeholde uopløst stof.

Opløsningerne holdes ved konstant temperatur ($\pm$ 0,5 °C). Idet en opløsnings overfladespænding ændres i målekarret med tiden, må der foretages adskillige målinger på forskellige tidspunkter, og der afsættes en kurve, der viser overfladespændingen som funktion af tiden. Når overfladespændingen ikke ændres yderligere, er ligevægtstilstanden nået.

Støv og gasformig forurening med andre stoffer forstyrrer målingen, hvorfor arbejdet bør udføres under et beskyttende dække.

1.6.5. **Testebetingelser**

Målingerne foretages ved ca. 20 °C, og temperaturen skal holdes inden for $\pm$ 0,5 °C.

1.6.6. **Udførelse af testen**

De opløsninger, som skal måles, fyldes i det omhyggeligt rengjorte målekar, idet man undgår skumning. Målekarret anbringes på apparatets prøvebord. Bordet med målekarret hæves, indtil ringen er nedsænket fuldstændigt i den opløsning, som skal måles. Derefter sænkes bordet jævnt og gradvis (med en hastighed på ca. 0,5 cm/min) for at løsrive ringen fra overfladen, indtil den største kraft er nået. Det væskelag, som hænger ved ringen, må ikke fjernes fra denne. Når målingen er udført, nedsænkes ringen atter i væsken, og målingen gentages, indtil der opnås konstante værdier for overfladespændingen. Den tid, der er gået fra overførsel af opløsningen til målekarret og til selve målingen udføres, noteres ved hver bestemmelse. Aflæsningerne skal foretages ved den største kraft, som kræves til løsrivning af ringen fra væskeoverfladen.

2. DATA

For at beregne overfladespændingen skal den værdi, som er aflæst i mN/m på apparatet, først multipliceres med kalibreringsfaktoren Φ_a eller Φ_b (afhængigt af den anvendte kalibreringsmetode). Dette giver en værdi, som kun gælder tilnærmelsesvis, og som derfor kræver korrektion.

Harkins og Jordan (4) har empirisk bestemt korrektionsfaktorer for værdier af overfladespændingen, som er bestemt med ringmetoden; disse faktorer afhænger af ringens dimensioner, væskens massefylde og dens overfladespænding.

Da det er besværligt for hver enkelt måling at bestemme korrektionsfaktoren ud fra Harkins og Jordans tabeller for at beregne overfladespænding, kan man for vandige opløsninger benytte en forenklet metode, hvor de korrigerede værdier for overfladespændingen direkte aflæses i den nedenstående tabel (der anvendes interpolation til aflæsninger, som ligger mellem tabelværdierne).

TABEL: KORREKTION AF DEN MÅLTE OVERFLADESPÆNDING

Kun for vandige opløsninger, $\rho = 1\ g/cm^3$

R = 9,55 mm (gennemsnitlig ringradius)

r = 0,185 mm (ringtrådens radius)

Eksperimentel værdi (mN/m)	Korrigeret værdi (mN/m)	
	kalibrering med lodder (se 1.6.4.2.2. a))	kalibrering med vand (se 1.6.4.2.2. b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Denne tabel er udarbejdet på basis af Harkins-Jordan korrektioner, og ligner den, der er i DIN-standarden (DIN 53914) for vand og vandige opløsninger (massefylde $\rho = 1\ g/cm^3$) og for en kommerciel tilgængelig ring med dimensionerne R = 9,55 mm (middelringradius) og r = 0,185 mm (ringtrådens radius). Tabellen angiver korrigerede værdier for overfladespændingsmålinger, der er foretaget efter kalibrering med lodder eller vand.

Alternativt kan overfladespændingen uden forudgående kalibrering beregnes efter følgende formel:

$$\sigma = \frac{f \cdot F}{4 \pi R}$$

hvor:

F = kraften målt på dynamometeret, idet hinden brydes

R = ringens radius

f = korrektionsfaktoren (1).

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— anvendt type vand eller opløsning

— nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder)

— måleresultater: overfladespænding (aflæsning) med angivelse af både de enkelte målinger, deres middelværdi og den korrigerede middelværdi (med hensyn til apparatfaktoren og korrektionstabellen)

— opløsningens koncentration

— testtemperaturen

— den anvendte opløsnings alder, og specielt den tid, der er forløbet mellem fremstillingen af opløsningen og målingen

— beskrivelse af overfladespændingens tidsafhængighed efter overførsel til målekarret

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstandsform.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

På baggrund af vands overfladespænding på 72,75 mN/m ved 20 °C anses stoffer med en overfladespænding på mindre end 60 mN/m bestemt ved denne metode for at være overfladeaktive.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

A.6 VANDOPLØSELIGHED

1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1).

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets strukturformel, damptryk, dissociationskonstant og hydrolyse (som funktion af pH).

Der findes ikke én enkelt metode, der dækker hele området af vandopløselighed.

De to testmetoder, der er beskrevet nedenfor, dækker hele opløselighedsområdet, men egner sig ikke til flygtige stoffer:

— en der kan anvendes til stoffer, som i det væsentlige er rene, med lav opløselighed ($< 10^{-2}$ g/l), og som er stabile i vand, betegnet »kolonne-eluerings-metoden«.

— en der kan anvendes til stoffer, som i det væsentlige er rene, med større opløselighed ($> 10^{-2}$ g/l), og som er stabile i vand, betegnet »kolbe-metoden«.

De undersøgte stoffers vandopløselighed kan i betragtelig grad afhænge af tilstedeværelsen af urenheder.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Et stofs opløselighed i vand angives ved mætningskoncentrationen af stoffet i vand ved en given temperatur. Opløseligheden i vand angives i enheden masse pr. rumfang opløsning. SI-enheden er kg/m^3 (g/l kan også anvendes).

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. PRØVNINGSMETODENS PRINCIP

Ved en simpel foreløbig test undersøges, omtrentligt hvor meget materiale og hvor lang tid der kræves til at nå mætningskoncentrationen.

1.4.1. Kolonne-eluerings-metoden

Denne metode er baseret på eluering af det undersøgte stof med vand fra en mikrokolonne, der indeholder et inert bæremateriale såsom glaskugler eller sand, belagt med overskud af teststof. Vandopløseligheden bestemmes, når koncentrationen i eluatet bliver konstant. Dette fremkommer som et koncentrationsplateau som en funktion af tiden.

1.4.2. Kolbe-metoden

Ved denne metode opløses stoffet (faste stoffer pulveriseres) i vand ved en temperatur noget over testningstemperaturen. Når mætning er opnået, afkøles blandingen til testningstemperatur og holdes der under omrøring så længe, som det er nødvendigt for at opnå ligevægt. Alternativt kan målingen foretages direkte ved testningstemperaturen, hvis det ved passende prøvetagning godtgøres, at mætningsligevægten er nået. Derefter bestemmes massekoncentrationen af stoffet i den vandige opløsning, der ikke må indeholde uopløste partikler, ved en passende analysemetode.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhed**

For kolonne-eluerings-metoden er det muligt at opnå < 30 %; for kolbe-metoden bør den være < 15 %.

1.5.2. **Følsomhed**

Denne afhænger af analysemetoden, men det er muligt at bestemme så lav en massekoncentration som 10^{-6} g/l.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Testningsbetingelser**

Testen udføres helst ved 20 °C ± 0,5 °C. Hvis der er mistanke om, at opløseligheden er temperaturafhængig (> 3% pr. °C) udføres der også undersøgelser ved to andre temperaturer, der er mindst 10 °C over og under den først valgte temperatur. I så tilfælde må temperaturkontrollen være ± 0,1 °C. Den valgte temperatur bør holdes konstant i alle relevante dele af udstyret.

1.6.2. **Indledende test**

Til ca. 0,1 g af prøven (faste stoffer må være pulveriserede) i et 10 ml måleglas med glasprop sættes stigende mængder destilleret vand ved stuetemperatur, efter de i tabellen nedenfor angivne trin.

0,1 g stof opløselig i »x« ml vand	0,1	0,5	1	2	10	100	>100
omtrentlig opløselighed (g/l)	>1 000	1 000-200	200-100	100-50	50-20	10-1	<1

Efter hver tilsætning af den angivne mængde vand til blandingen omrystes der kraftigt i 10 minutter, og det undersøges visuelt, om der er noget uopløst af prøven tilbage. Hvis prøven eller dele af prøven forbliver uopløst, efter at der er tilsat 10 ml, gentages forsøget i et 100 ml måleglas med en større vandmængde. Ved lavere opløseligheder kan den tid, der kræves til opløsning af et givet stof, være betragteligt længere (der bør ventes mindst 24 timer). Den anslåede opløselighed er angivet i tabellen under det rumfang af tilsat vand, der netop forårsagede en fuldstændig opløsning af prøven. Hvis stoffet stadig er tilsyneladende uopløst, øges henstandstiden ud over de 24 timer (højst 96 timer), eller der foretages yderligere fortynding, så det kan afgøres, om det er kolonne-elueringS- eller kolbe-metoden, der skal anvendes.

1.6.3. **Kolonne-elueringS-metoden**

1.6.3.1. *Bærematerіale, opløsningsmiddel og elueringsmiddel*

Bærematerialet til kolonne-elueringS-metoden skal være inert. Mulige materialer, der kan anvendes, er glaskugler og sand. Der anvendes et passende flygtigt opløsningsmiddel af analysekvalitet til at overføre teststoffet til bærematerialet. Som opløsningsmiddel anvendes der vand, der er dobbelt destilleret i glas- eller kvartsapparatur.

Bemærk:

Vand direkte fra en organisk ionbytter må ikke anvendes.

1.6.3.2. *Afsætning på bæremateriale*

Ca. 600 mg bæremateriale afvejes og overføres til en 50 ml rundbundet kolbe.

En passende, afvejet mængde af prøven opløses i det valgte opløsningsmiddel. En passende mængde af denne opløsning sættes til bæremateriale. Opløsningsmidlet skal afdampes fuldstændigt, f.eks. i en rotationsinddamper; i modsat fald vil der ikke kunne opnås mætning af bæremateriale med vand som følge af fordelingseffekter på overfladen af bæremateriale.

Afsætningen på bæremateriale kan give problemer (fejlagtige resultater), hvis det undersøgte stof afsættes som en olie eller i en anden krystalstruktur. Dette problem må undersøges eksperimentelt, og resultaterne rapporteres.

Det behandlede bæremateriale henstilles til kvældning i ca. to timer i ca. 5 ml vand, hvorefter suspensionen overføres til mikrokolonnen. Alternativt kan det tørre behandlede bæremateriale hældes i mikrokolonnen, der er fyldt med vand, og derefter henstå i ca. to timer til opnåelse af ligevægt.

Testprocedure:

Elueringen af stoffet fra bæremateriale kan udføres på en af de to forskellige måder:

— med recirkulationspumpe (se figur 1)

— med niveaubeholder (se figur 4).

1.6.3.3. *Kolonne-elu erings-metoden med recirkulationspumpe*

Apparatur

Et typisk system er vist skematisk i figur 1. En egnet mikrokolonne er vist i figur 2, omend en hvilken som helst størrelse kan anvendes, forudsat at den opfylder kriterierne for reproducerbarhed og følsomhed. Kolonnen skal have et head-space på mindst fem bed-volumen vand og kunne rumme mindst fem prøver. Alternativt kan størrelsen reduceres, hvis der tilsættes opløsningsmiddel som erstatning for de første fem bed-rumfang, der fjernes med urenheder.

Kolonnen skal forbindes til en recirkulationspumpe, der kan reguleres til en strømningshastighed på ca. 25 ml/h. Pumpen forbindes med tilslutning af polytetrafluoroethylen (PTFE) og/eller glas. Kolonnen og pumpen skal, når de er forbundet, give mulighed for udtagning af prøver af den eluerede væske og for indstilling af head-space-ligevægt ved atmosfæretryk. Kolonnematerialet holdes oppe med en lille (5 mm) prop af glasuld, der også fungerer som filter for partikler. Recirkulationspumpen kan f.eks. være en slangepumpe (man må være omhyggelig med ikke at få kontaminering af og/eller sorption på slangematerialet) eller en membranpumpe.

Fremgangsmåde ved målingen

Væskestrømmen gennem kolonnen startes. Det anbefales at bruge en strømningshastighed på ca. 25 ml/h (hvilket svarer til ca. ti bed-rumfang pr. time for den beskrevne kolonne). De første fem bed-rumfang (minimum) bortkastes, så vandopløselige urenheder fjernes. Derefter kører recirkulationspumpen, til der er opnået ligevægt, defineret ved at fem på hinanden følgende prøver giver koncentrationer, der ikke afviger mere end ± 30 % på tilfældig måde. Disse prøver bør være adskilt fra hinanden ved tidsintervaller, der svarer til et gennemløb af mindst ti bed-rumfang af opløsningsmiddel.

1.6.3.4. *Kolonne-elu erings-metoden med niveaubeholder*

Apparatur (se figur 4 og 3)

Niveaubeholder: Forbindelsen til niveaubeholderen etableres ved at anvende et glasslibovergangsstykke, der tilsluttes med en PTFE-slange. Det anbefales, at der anvendes en gennemstrømningshastighed på ca. 25 ml/time. Successive fraktioner af eluatet opsamles og analyseres efter den valgte metode.

Fremgangsmåde ved målingen

De fraktioner fra det midterste elueringsområde, hvor koncentrationerne er konstante (± 30 %) i mindst fem på hinanden følgende prøver, anvendes til at bestemme opløseligheden i vand.

I begge tilfælde (anvendelse af recirkulationspumpe eller niveaubeholder) udføres endnu et forsøg med halvt så høj gennemstrømningshastighed som det første. Hvis resultaterne fra de to forsøg stemmer overens, er testen tilfredsstillende; hvis der er en større opløselighed ved den lavere hastighed, må halveringen af gennemstrømningshastigheden fortsættes, indtil to på hinanden følgende forsøg giver samme opløselighed.

I begge tilfælde (anvendelse af recirkulationspumpe eller niveaubeholder) kontrolleres fraktionerne for tilstedeværelse af kolloidt materiale ved hjælp af Tyndall-effekten (lysspredning). Tilstedeværelse af sådanne partikler gør resultaterne ubrugelige, og testen må gentages efter forbedring af kolonnens filtreringsformåen.

pH i alle prøver registreres. Der udføres endnu et forsøg ved samme temperatur.

1.6.4. Kolbe-metoden

1.6.4.1. *Apparatur*

Til kolbe-metoden kræves følgende udstyr:

— normalt laboratorieglasudstyr og -instrumentering

— udstyr til rystning/omrøring af opløsninger ved kontrolleret konstant temperatur

— eventuelt en centrifuge (helst termostateret) til emulsioner og

— udstyr til analytisk bestemmelse.

1.6.4.2. *Fremgangsmåde ved målingen*

Den mængde materiale, der er nødvendig for at mætte det ønskede rumfang vand, anslås ud fra den foreløbige test. Det fornødne rumfang vand vil afhænge af den analytiske metode og opløselighedsområdet. Ca. fem gange den mængde stof, der er bestemt ovenfor, afvejes i hver af tre beholdere med glasprop (f.eks. centrifugeglas eller kolber). Det valgte rumfang vand sættes til hver beholder, og beholderne lukkes helt tæt. De lukkede beholdere rystes/omrøres derefter ved 30 °C. (Der anvendes ryste- eller omrørerudstyr, som kan operere ved konstant temperatur, f.eks. magnetomrøring i et termostatbad). Efter en dag fjernes én af beholderne, og den henstilles til opnåelse af ligevægt i 24 timer ved den ønskede temperatur og lejlighedsvis omrystning. Indholdet i beholderen centrifugeres derefter ved testtemperaturen, og koncentrationen af stoffet i den klare vandige fase bestemmes med en passende analysemetode. De andre to kolber behandles på samme måde efter forudgående opnåelse af ligevægt ved 30 °C i henholdsvis to og tre dage. Hvis koncentrationsresultaterne fra mindst to af beholderne opfylder den krævede reproducerbarhed, er testen tilfredsstillende. Hvis resultaterne fra beholder 1, 2 og 3 viser en stigende tendens, gentages hele forsøget under anvendelse af længere tider til opnåelse af ligevægt.

Måleproceduren kan også udføres uden forudgående henstand ved 30 °C. Der opnås et skøn over, hvor hurtigt mætningsligevægten indstiller sig, ved udtagning af prøver, indtil omrøringstiden ikke længere indvirker på prøveopløsningens koncentration.

pH i alle prøver registreres.

1.6.5. Analyse

Der foretrækkes en stofspecifik analysemetode til disse bestemmelser, eftersom små mængder af opløselige urenheder kan forårsage store fejl i den målte opløselighed. Eksempler på sådanne metoder er gas- eller væskechromatografi, titreringsmetoder, fotometriske metoder og voltametriske metoder.

2. DATA

2.1. KOLONNE-ELUERINGS-METODEN

Middelværdien samt standardafvigelsen for mindst fem på hinanden følgende prøver taget ved mætningsplateauet udregnes for hvert forsøg. Resultaterne anføres i masseenhed pr. volumenenhed opløsning.

Gennemsnittene fra to forsøg med forskellige strømningshastigheder sammenlignes, og repeterbarheden skal være bedre end 30 %.

2.2. KOLBE-METODEN

De enkelte resultater skal angives for hver af de tre kolber, og for de resultater, der skønnes at være konstante (repeterbarhed bedre end 15 %), beregnes gennemsnittet, og det angives i masseenhed pr. volumenenhed opløsning. Dette kan kræve omregning af masseenhed til volumenenhed ved hjælp af massefylden, hvis opløseligheden er meget høj (>100 g/l).

3. RAPPORTERING

3.1. KOLONNE-ELUERINGS-METODEN

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— resultaterne af den foreløbige test

— nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder)

— koncentration, gennemstrømningshastighed og pH for hver enkelt prøve

— middelværdi og standardafvigelse for mindst fem prøver fra mætningsplateauet fra hvert forsøg

— gennemsnittet af to successive, acceptable forsøg

— vandtemperaturen under mætningsprocessen

— den anvendte analysemetode

— arten af det anvendte bæremateriale

— afsætning på bærematerialet

— anvendt opløsningsmiddel

— tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen og den anvendte metode

— alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstandsform.

3.2. KOLBE-METODEN

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— resultaterne af den foreløbige test

— nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder)

— de enkelte analyseresultater og gennemsnittet, når der er bestemt mere end én værdi for hver kolbe

— pH i hver prøve

— gennemsnitsværdien for de forskellige kolber, der stemte overens

— analysetemperaturen

— den anvendte analysemetode

— tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen og den anvendte metode

— alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstandsform.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.

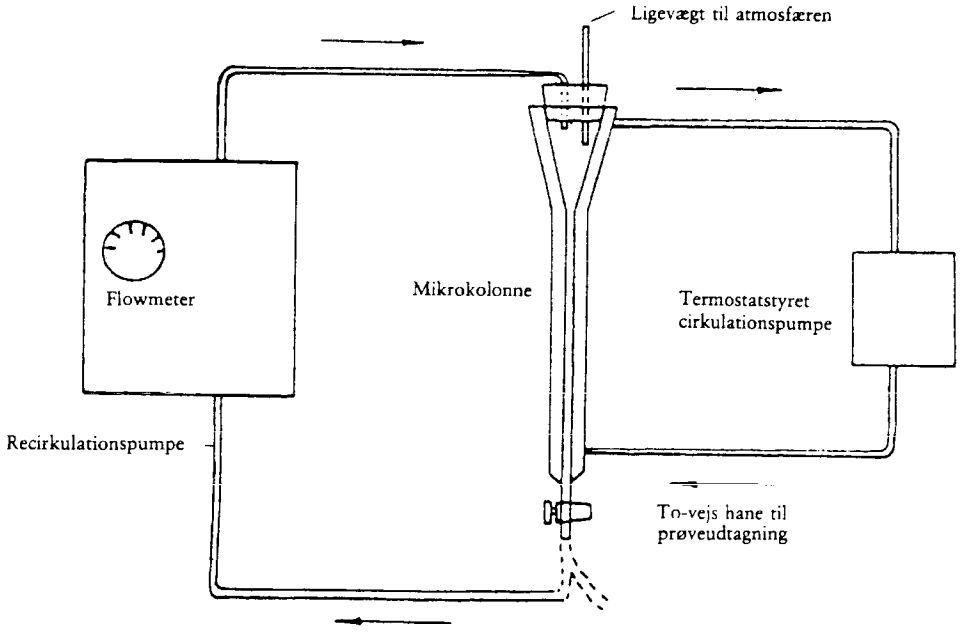
(2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

Tillæg

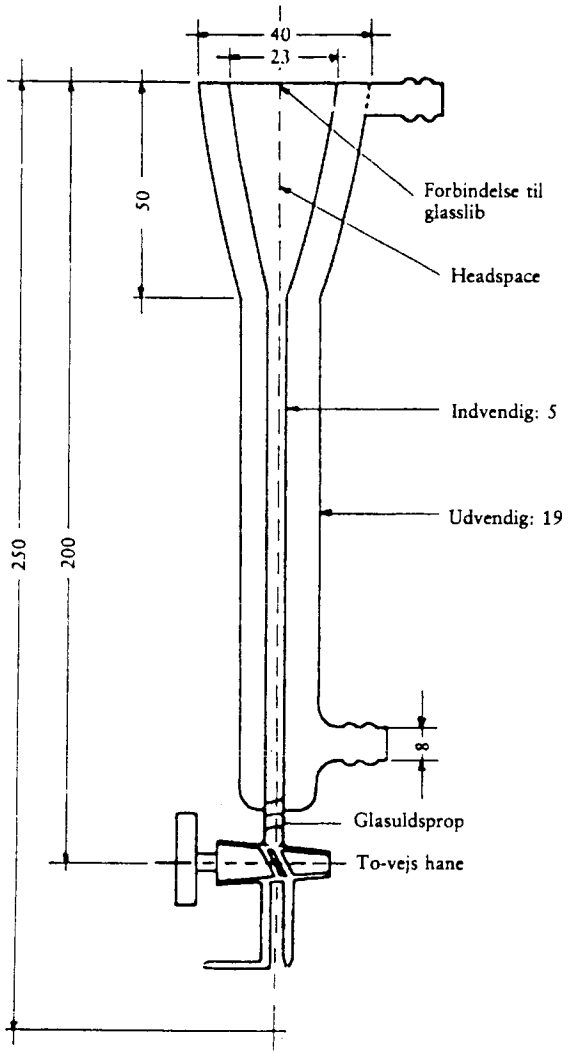
Figur 1

Kolonne-eluerings-metoden med recirkulationspumpe



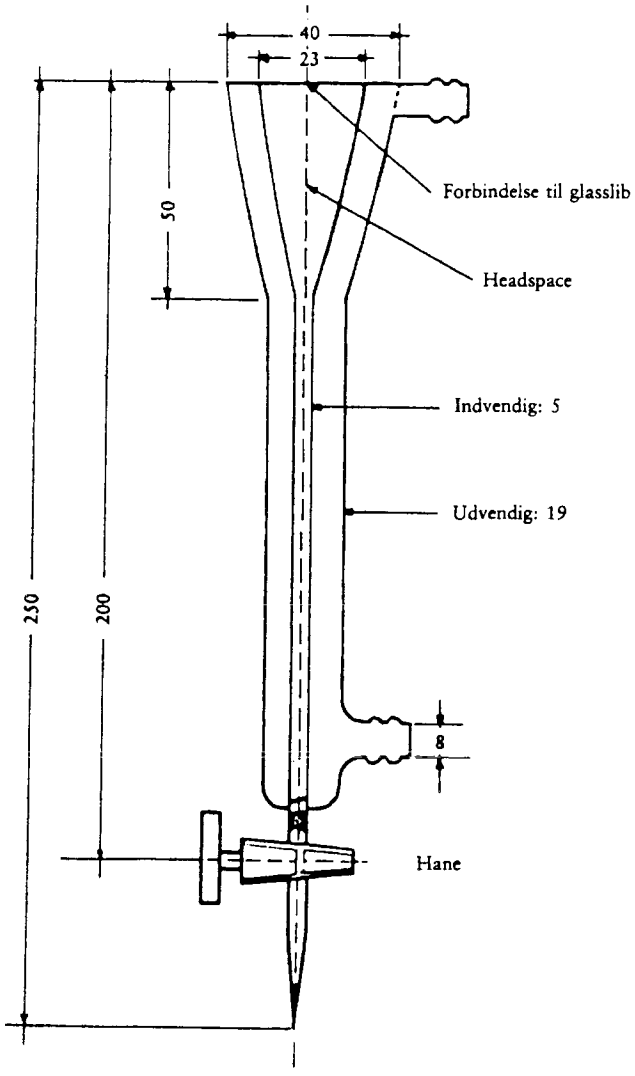
Figur 2

En typisk mikrokolonne
(alle dimensioner er i mm)



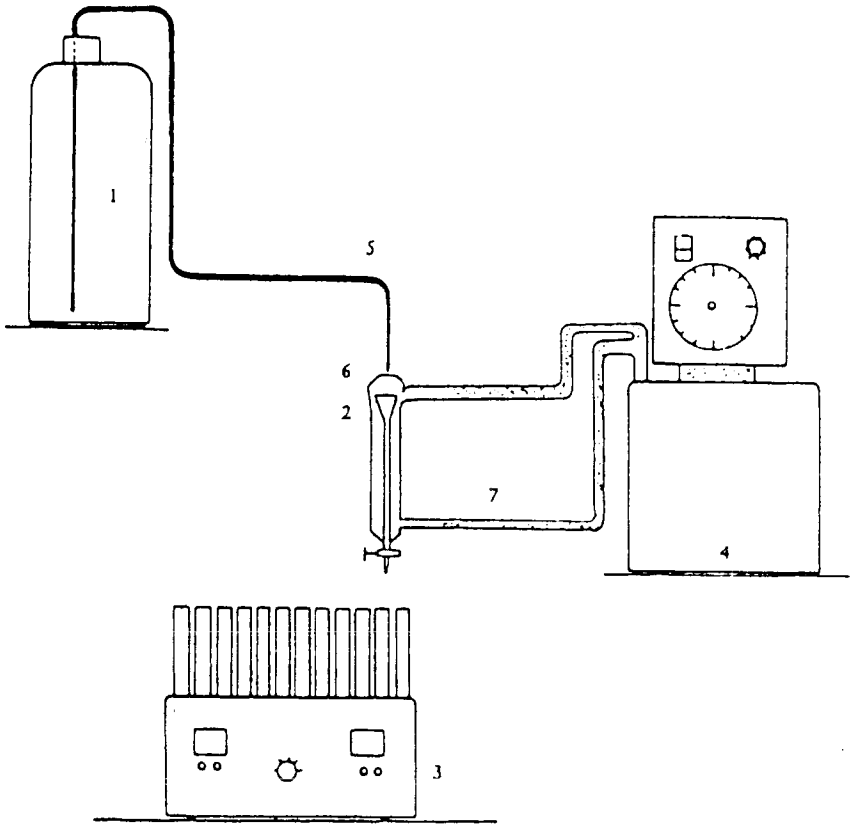
Figur 3

En typisk mikrokolonne
(alle dimensioner er i mm)



Figur 4

Kolonne-eluerings-metoden med niveaubeholder



1 = Niveaubeholder (f.eks. 2,5 l standflaske)
2 = Kolonne (se figur 3)
3 = Fraktionssamler
4 = Termostat
5 = Teflonslange
6 = Glasslibforbindelse
7 = Vandslange (mellem termostat og kolonne, indre diameter: ca. 8 mm).

A.8 FORDELINGSKOEFFICIENT

1. METODE

Den beskrevne »rystekolbemetode« er baseret på OECD-testvejledningen (1).

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets strukturformel, dissociationskonstant, vandopløselighed, hydrolyse, opløselighed i n-octanol og overfladespænding.

Målinger på ioniserbare stoffer udføres på den ikke-ioniserede form (fri syre eller fri base) dvs. ved anvendelse af en passende buffer med en pH-værdi på mindst 1 enhed under (fri syre) eller over (fri base) stoffets pK-værdi.

Testmetoden omfatter to særskilte fremgangsmåder — rystekolbemetoden og højtydende væskekromatografi (HPLC). Førstnævnte er brugbar, når værdien af log P_{ow} (se definitionerne nedenfor) ligger mellem – 2 og 4, og sidstnævnte i området mellem 0 og 6. Førend nogen af fremgangsmåderne påbegyndes, foretages der er foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten.

Rystekolbemetoden kan kun benyttes for stoffer, der i alt væsentligt er rene, og som er opløselige i vand og n-octanol. Den kan ikke anvendes til overfladeaktive materialer (for hvilke der anføres en beregnet værdi eller et skøn baseret på opløseligheden i henholdsvis n-octanol og vand).

HPLC-metoden kan ikke benyttes til stærke syrer og baser, metalkomplekser, overfladeaktive stoffer og stoffer, der reagerer med elueringsmidlet. For sådanne materialer anføres der en beregnet værdi eller et skøn baseret på opløseligheden i henholdsvis n-octanol og vand.

HPLC-metoden er mindre følsom end rystekolbemetoden over for urenheder i teststoffet. Ikke desto mindre kan urenheder i visse tilfælde vanskeliggøre fortolkningen af resultaterne på grund af usikker tilforordning af toppene. For blandinger med et uopløst bånd anføres en øvre og nedre grænse for log P.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Fordelingkoefficienten (P) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne (ci) af et stof, der er opløst i et tofasesystem bestående af to stort set ublandbare opløsningsmidler. I tilfældet n-octanol og vand:

$$P_{ow} = \frac{c_{\text{n-octanol}}}{c_{\text{vand}}}$$

Fordelingskoefficienten (P) er derfor et forhold mellem to koncentrationer og opgives ofte som titalslogaritmen (log P).

1.3. REFERENCESTOFFER

Rystekolbemetoden

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

HPLC-metoden

For at kunne korrelere målte HPLC-data for et stof med dets P-værdi må der fastlægges en kalibreringskurve for log P mod kromatografiske data, som er baseret på mindst seks referencepunkter. Det er op til brugeren at vælge de egnede referencestoffer. Så vidt muligt skal der være mindst ét referencestof med en P_{ow}-værdi, der

ligger over teststoffets, og mindst ét med en P_{ow}-værdi under teststoffets. For værdier af log P under 4 kan kalibreringen baseres på data opnået med rystekolbemetoden. For værdier af log P over 4 kan kalibreringen baseres på validerede litteraturværdier, hvis de stemmer overens med beregnede værdier. Af hensyn til nøjagtigheden anbefales at vælge referencestoffer, der strukturmæssigt ligner teststoffet.

Der foreligger omfattende lister med værdier for log P_{ow} for mange grupper af kemikalier (2)(3). Hvis der ikke foreligger data om fordelingskoefficienter for strukturmæssigt beslægtede stoffer, kan der bruges en mere generel kalibrering foretaget med andre referencestoffer.

Der er i tillæg 2 en liste over anbefalede referencestoffer og deres P_{ow}-værdier.

1.4. METODENS PRINCIP

1.4.1. Rystekolbemetoden

For at kunne bestemme fordelingskoefficienten må der opnås ligevægt mellem alle komponenterne i systemet, og koncentrationerne af de i de to faser opløste stoffer må bestemmes. En gennemgang af litteraturen herom har vist, at der kan benyttes en række forskellige teknikker til at løse dette problem, dvs. omhyggelig blanding af de to faser og bestemmelse af ligevægtskoncentrationen af det undersøgte stof efter adskillelse af faserne.

1.4.2. HPLC-metoden

HPLC udføres på analytiske kolonner pakket med en kommercielt tilgængelig fast fase indeholdende lange kulbrintekæder (f.eks. C_8, C_{18}) kemisk bundet til silica. Indsprøjtes der kemikalier på en sådan kolonne, vil de vandre gennem den med forskellig hastighed, da deres fordeling mellem den mobile fase og den stationære kulbrintefase ikke er den samme. Kemikalieblandinger elueres i rækkefølge efter hydrofobicitet, idet de vandopløselige kemikalier elueres først og de olieopløselige sidst, alt efter deres kulbrinte/vand-fordelingskoefficient. Derved kan sammenhængen mellem retentionstiden på en sådan kolonne (med omvendt fase) og n-octanol/vand-fordelingskoefficienten fastslås. Fordelingskoefficienten udledes af kapacitetsfaktoren k, der er givet ved udtrykket

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

hvor t_R er teststoffets retentionstid og t_0 er den tid, et opløsningsmiddelmolekyle i gennemsnit bruger på at komme gennem kolonnen (kolonnens dødtid).

Der kræves ikke kvantitative analysemetoder, og det er kun nødvendigt at bestemme retentionstiderne.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. Repeterbarhed

Rystekolbemetoden

For at opnå en tilstrækkeligt nøjagtig fordelingskoefficient foretages der dobbeltbestemmelse under tre forskellige testbetingelser, hvor både stofmængden og forholdet mellem opløsningsmidlerne kan varieres. De fundne værdier af fordelingskoefficienten skal, når de udtrykkes som titalslogaritmer, ligge inden for et interval på ± 0,3.

HPLC-metode

For at øge tilliden til målingen foretages der dobbeltbestemmelse. Værdier af log P beregnet ud fra de enkelte målinger skal ligge inden for et interval på ± 0,1.

1.5.2. **Følsomhed**

Rystekolbemetoden

Metodens måleområde afgrænses af analysemetodens påvisningsgrænse. Den skal tillade bestemmelse af værdier for log P_{ow} i området fra – 2 til 4 (under visse omstændigheder op til 5), når koncentrationen af opløst stof ikke er større end 0,01 mol pr. liter i nogen af faserne.

HPLC-metoden

Med HPLC-metoden kan der skønnes fordelingskoefficienter i log P_{ow}-området fra 0 til 6.

Normalt kan en forbindelses fordelingskoefficient skønnes med en afvigelse på mindre end ± 1 fra den værdi, der opnås med rystekolbemetoden. Typiske korrelationer fremgår af litteraturen (4)(5)(6)(7)(8). Der kan normalt opnås større nøjagtighed, hvis der anvendes korrelationskurver bestemt med strukturmæssigt beslægtede referencestoffer (9).

1.5.3. **Specificitet**

Rystekolbemetoden

Nernsts fordelingslov gælder kun for fortyndede opløsninger ved konstant temperatur, tryk og pH. Den gælder kun for et enkelt stof, der er fordelt mellem to rene opløsningsmidler. Hvis der forekommer flere opløste stoffer i den ene eller i begge faser samtidig, kan dette påvirke resultaterne.

Dissociering eller associering af de opløste molekyler resulterer i afvigelser fra Nernsts fordelingslov. At fordelingskoefficienten afhænger af opløsningens koncentration er tegn på en sådan afvigelse.

På grund af de mange involverede ligevægte, må metoden ikke anvendes på ioniserbare stoffer uden korrektion. For sådanne stoffer kan det overvejes at benytte bufferopløsninger i stedet for vand; i så fald skal bufferens pH ligge mindst 1 enhed fra stoffets pKa, og dette pH's relevans for miljøet skal overvejes.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Indledende skøn over fordelingskoefficienten**

Der kan dannes et skøn over fordelingskoefficienten enten ved beregning (se tillæg 1), hvilket foretrækkes, eller i givet fald ud fra teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler (10).

1.6.2. **Rystekolbemetoden**

1.6.2.1. *Forberedelser*

n-octanol: bestemmelsen af fordelingskoefficienten udføres med reagenser af analysekvalitet.

vand: der anvendes vand, som er destilleret eller dobbeltdestilleret i glas- eller kvartsapparatur. Til ioniserbare forbindelser benyttes der bufferopløsninger i stedet for vand, hvis der er gode grunde hertil.

Bemærk:

Der må ikke bruges vand taget direkte fra en ionbytter.

1.6.2.1.1. Formætning af opløsningsmidlerne

Før en fordelingskoefficient bestemmes, mættes hver af de faser, der indgår i opløsningsmiddelsystemet, med den anden fase ved rystning ved forsøgstemperaturen. Hertil er det praktisk at ryste to store standflasker med henholdsvis n-octanol af analysekvalitet og vand med tilstrækkelig meget af det andet opløsningsmiddel på et mekanisk rysteapparat i 24 timer, og derefter lade dem henstå så længe, at faserne skiller og der er opnået mætning.

1.6.2.1.2. Forberedelse af testen

Testbeholderen skal være næsten helt fyldt af tofasesystemet. Derved hindres materialetab ved fordampning. Stofmængder og volumenforhold fastlægges på grundlag af:

— det foreløbige skøn over fordelingskoefficienten (se ovenfor)

— den mængde teststof, der mindst kræves til analysen

— en øvre koncentrationsgrænse på 0,01 mol/l for begge faser.

Der udføres tre tests. I den første bruges det beregnede volumenforhold mellem n-octanol og vand; i den anden divideres dette forhold med 2 og i det tredje multipliceres det med 2 (f.eks. 1:1, 1:2 og 2:1).

1.6.2.1.3. Teststof

Der fremstilles en stamopløsning i n-octanol, der på forhånd er mættet med vand. Denne stamopløsnings koncentration bestemmes nøjagtigt, inden den anvendes til bestemmelse af fordelingskoefficienten. Den opbevares under betingelser, hvor den er stabil.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testtemperaturen skal holdes konstant (± 1 °C) og ligge mellem 20 og 25 °C.

1.6.2.3. *Fremgangsmåde ved målingen*

1.6.2.3.1. Opnåelse af fordelingsligevægt

For hver af testbetingelserne benyttes der to testbeholdere, der hver indeholder den nødvendige nøjagtigt afmålte mængde af de to opløsningsmidler og den nødvendige mængde stamopløsning.

n-octanolfaserne afmåles volumetrisk. Testbeholderne kan enten anbringes i et egnet rysteapparat eller rystes i hånden. Når et centrifugeglas benyttes, anbefales en hurtig 180 drejning om tværaksen af glasset, hvorved den indespærrede luft stiger op gennem de to faser. Erfaringen viser, at 50 sådanne drejninger normalt er tilstrækkeligt til, at fordelingsligevægten indtræder. For en sikkerheds skyld anbefales det at foretage 100 drejninger i løbet af 5 minutter.

1.6.2.3.2. Faseadskillelse

Blandingen kan om nødvendigt centrifugeres, så faserne adskilles. Det gøres i en laboratoriecentrifuge ved stuetemperatur; hvis der benyttes en centrifuge uden temperaturregulering, henstår centrifugeglassene i én time ved testtemperaturen til opnåelse af ligevægt før analyse.

1.6.2.4. *Analyse*

Til bestemmelse af fordelingskoefficienten må koncentrationen af teststoffet i begge faser bestemmes. Det kan gøres ved, at der for hver testbetingelse udtages en delprøve af hver fase fra hvert glas, som analyseres ved den valgte metode. Den samlede mængde stof i begge faser beregnes og sammenlignes med den oprindeligt tilsatte stofmængde.

Prøven af vandfasen udtages på en sådan måde, at risikoen for, at den indeholder spor af n-octanol, bliver minimal, nemlig med en glasinjektionssprøjte. Fra starten skal sprøjten være delvis fyldt med luft, som langsomt trykkes ud, medens kanylen føres ned gennem n-octanollaget. En passende mængde af vandfasen suges op i sprøjten, som hurtigt trækkes op af opløsningen, og kanylen fjernes. Sprøjtens indhold kan nu benyttes som den vandige prøve. Koncentrationen i de to adskilte faser skal helst bestemmes ved en stofspecifik metode. Eksempelvis er følgende analysemetoder egnede:

— fotometriske metoder

— gaskromatografi

— højtydende væskekromatografi (HPLC).

1.6.3. **HPLC-metode**

1.6.3.1. *Forberedelser*

Apparatur

Der kræves en væskekromatograf med pulsationsfri pumpe og passende detektionssystem. Det anbefales at bruge injektionsventil med injektionsspiral. Polære grupper i den stationære fase kan nedsætte HPLC-kolonnens ydeevne væsentligt. Derfor må stationære faser have det lavest mulige procentindhold af polære grupper (11). Der kan anvendes kommercielle mikroniserede pakkematerialer med omvendt fase eller færdigpakkede kolonner. Der kan eventuelt anbringes en beskyttelseskolonne mellem injektionssystemet og analysekolonnen.

Mobil fase

Der anvendes methanol og vand af HPLC-kvalitet til fremstilling af elueringsvæsken, som afgasses før brugen. Der benyttes isokratisk eluering. Den anvendte methanol/vand-blanding skal indeholde mindst 25 % vand. Til eluering af forbindelser med en log P på 6 på én time ved en flowhastighed på 1 ml/min vil en blanding af methanol og vand i forholdet 3:1 (v/v) typisk være tilfredsstillende. For forbindelser med en høj log P-værdi kan det være nødvendigt at nedsætte elueringstiden (også for referencestofferne) ved at benytte en mindre polær mobil fase eller en kortere kolonne.

Stoffer med meget lav opløselighed i n-octanol har tendens til at give unormalt lave værdier for log P_{ow} med HPLC-metoden; undertiden følger sådanne forbindelsers toppe opløsningsmiddelfronten. Dette skyldes sandsynligvis, at fordelingsprocessen er for langsom til, at der opnås ligevægt inden for den tid, en HPLC-adskillelse normalt tager. I så fald kan nedsættelse af flowhastigheden og/eller mindskelse af methanol/vand-forholdet være et virkningsfuldt middel til at opnå en pålidelig værdi.

Både teststof og referencestoffer skal være opløselige i den mobile fase i en så høj koncentration, at de kan påvises. Der må kun undtagelsesvis benyttes tilsætningsstoffer til methanol/vand-blandingen, da tilsætningsstoffer vil ændre kolonnens egenskaber. Til kromatogrammer med tilsætningsstoffer skal der altid anvendes en separat kolonne af samme type. Hvis methanol/vand ikke er egnet, kan der anvendes andre blandinger af vand og organiske opløsningsmidler, f.eks. ethanol/vand eller acetonitril/vand.

For ioniserbare stoffer er elueringsvæskens pH kritisk. Det skal ligge inden for kolonnens driftsområde, som normalt er fra 2 til 8. Det anbefales at anvende buffer. Man må være omhyggelig med at undgå saltudfældning og ødelæggelse af kolonnen, hvilket kan forekomme med visse blandinger af organisk fase og buffer. Det tilrådes ikke at foretage HPLC-målinger med silicabaserede stationære faser med pH over 8, da alkalisk mobil fase kan føre til, at kolonnens ydeevne hurtigt falder.

Opløste stoffer

Referencestoffer skal være af renest mulige kvalitet. Til testnings- og kalibreringsformål opløses stofferne om muligt i den mobile fase.

Testningsbetingelser

Under målingen må temperaturen ikke variere med mere end ± 2 K.

1.6.3.2. *Måling*

Beregning af dødtiden t_0

Dødtiden t_0 kan bestemmes enten med en homolog række (f.eks. n-alkylmethylketoner) eller med organiske stoffer, der ikke holdes tilbage (f.eks. thiourinstof eller formamid). Til beregning af dødtiden t_0 ud fra en homolog række, indsprøjtes der mindst syv elementer af en homolog række, og retentionstiderne bestemmes. Bruttoretentionstiderne $t_{r(n_c + 1)}$ afbildes mod $t_{r(n_c)}$, og i regressionsligningen:

$$t_{r(n_c + 1)} = a + b\, t_{r(n_c)}$$

bestemmes afskæringen a og hældningskoefficienten b (n_c = antallet af kulstofatomer). Dødtiden er da givet ved:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

Kalibreringskurve

Næste trin består i at konstruere en korrelationskurve af log k mod log P for passende referencestoffer. I praksis indsprøjtes der samtidig mellem fem og ti standardreferencestoffer, hvis log P ligger i det forventede område, og retentionstiderne bestemmes, helst med en integrationsskriver, der er koblet til detektionssystemet. De tilsvarende logaritmer til kapacitetsfaktorerne, log k, beregnes og afsættes mod den log P, der er bestemt ved rystekolbemetoden. Kalibreringen foretages regelmæssigt, mindst én gang dagligt, så der kan tages højde for eventuelle ændringer i kolonnens ydeevne.

Bestemmelse af teststoffets kapacitetsfaktor

Teststoffet indsprøjtes som en så lille mængde mobil fase som mulig. Retentionstiden bestemmes (dobbeltbestemmelse), hvorved kapacitetsfaktoren k kan beregnes. Ud fra korrelationskurven over referencestofferne kan teststoffets fordelingskoefficient interpoleres. Ved meget lave og meget høje fordelingskoefficienter er det nødvendigt at ekstrapolere. I sådanne tilfælde må man være særlig opmærksom på regressionslinjens konfidensgrænser.

2. DATA

Rystekolbemetoden

De målte P-værdiers pålidelighed kan kontrolleres ved sammenligning af gennemsnittet af dobbeltbestemmelserne med det samlede gennemsnit.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— en beregnet værdi eller et skøn baseret på de enkelte opløseligheder, hvis metoderne ikke kan anvendes (f.eks. overfladeaktivt materiale)

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand.

For rystekolbemetoden

— resultatet af et eventuelt indledende skøn

— den temperatur, som bestemmelsen er foretaget ved

— data om de analysemetoder, der er benyttet til koncentrationsbestemmelser

— eventuel centrifugeringstid og -hastighed

— målte koncentrationer i begge faser for hver bestemmelse (der skal således rapporteres i alt tolv koncentrationer)

— massen af teststof, det anvendte volumen af hver fase i hver testbeholder og den samlede beregnede mængde teststof i hver fase efter indstilling af ligevægt

— den beregnede værdi for fordelingskoefficienten (P) og gennemsnittet for hvert sæt testbetingelser samt gennemsnittet af samtlige bestemmelser. Eventuelle tegn på, at fordelingskoefficienten er koncentrationsafhængig anføres i rapporten

— de enkelte P-værdiers standardafvigelse fra gennemsnittet

— gennemsnitsværdien af P fra alle bestemmelser anføres tillige som titalslogaritmen

— den beregnede teoretiske værdi af P_{ow}, når denne værdi er bestemt eller når den målte værdi er $> 10^4$

— pH af det anvendte vand og af vandfasen under forsøget

— begrundelse for anvendelse af buffere i stedet for vand, deres sammensætning, koncentration og pH, samt vandfasens pH før og efter forsøget.

For HPLC-metoden

— resultatet af et eventuelt foreløbigt skøn

— test- og referencestoffer og deres renhedsgrad

— det temperaturinterval, som bestemmelserne er foretaget ved

— det pH, som bestemmelserne er foretaget ved

— detaljerede oplysninger om analyse- og beskyttelseskolonne, mobil fase og detektionssystem

— retentionsdata og litteraturværdier for log P for referencestoffer benyttet ved kalibrering

— detaljerede oplysninger om den fittede regressionslinje (log k mod log P)

— gennemsnitlige retentionsdata og interpoleret log P-værdi for teststoffet

— beskrivelse af udstyr og driftsbetingelser

— elueringsprofiler

— den mængde test- og referencestof, der er indført i kolonnen

— dødtiden og hvordan den er målt.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

Tillæg 1

Metoder til beregning/estimering

INDLEDNING

I Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) er der en generel indføring i beregningsmetoder samt data og eksempler.

Beregnede værdier for P_{ow} kan benyttes:

— til at afgøre, hvilken forsøgsmetode der er mest velegnet (rystekolbemetoden: log P_{ow} −2 til 4; HPLC-metoden: log P_{ow} 0 til 6)

— til at vælge de bedste forsøgsbetingelser (f.eks. referencestoffer til HPLC-metoden og volumenforholdet mellem n-octanol og vand til rystekolbemetoden)

— som intern laboratoriekontrol for eventuelle forsøgsfejl

— til at give et skøn over P_{ow} i de tilfælde, hvor man af tekniske årsager ikke kan anvende eksperimentelle metoder.

ESTIMERINGSMETODER

Foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten

Der kan foretages et skøn over værdien af fordelingskoefficienten ved hjælp af teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler:

Hertil benyttes:

$$P_{estimeret} = \frac{\text{mætnings } c_{n\text{-octanol}}}{\text{mætnings } c_{vand}}$$

BEREGNINGSMETODER

Princippet bag beregningsmetoderne

Alle beregningsmetoder er baseret på formel fragmentering af molekylet i passende delstrukturer, for hvilke man har pålideligt kendskab til log P_{ow}-bidrag. Log P_{ow} for hele molekylet beregnes dernæst som summen af fragmentværdierne plus summen af korrektionsudtryk for intramolekylære vekselvirkninger.

Der foreligger lister over fragmentkonstanter og korrektionsudtryk (b)(c)(d)(e). Nogle af dem ajourføres regelmæssigt (b).

Kvalitetskriterier

Sædvanligvis aftager beregningsmetodens pålidelighed med, at det undersøgte stofs kompleksitet stiger. For simple molekyler med lav molekylvægt og en eller to funktionelle grupper kan der forventes en afvigelse på 0,1 til 0,3 mellem resultatet af forskellige fragmenteringsmetoder og den målte værdi for log P_{ow}. Fejlmargenen kan være større for mere komplekse molekyler. Den afhænger af, om der foreligger fragmentkonstanter og hvor pålidelige de er, samt af, om intramolekylære vekselvirkninger (f.eks. hydrogenbindinger) erkendes, og om korrektionsudtrykkene anvendes korrekt (mindre problematisk med computerprogrammet CLOGP-3) (b). For ioniserbare forbindelsers vedkommende har det stor betydning, at ladningen eller ioniseringsgraden bedømmes korrekt.

Fremgangsmåde ved beregningen

Hansch's π-metode

Den oprindelige konstant for hydrofobe substituenter, π, som indførtes af Fujita m.fl. (f), defineres ved:

$$\pi_x = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

hvor P_{ow}(PhX) er fordelingskoefficienten for et aromatisk derivat og P_{ow}(PhH) er stamforbindelsens fordelingskoefficient

$$\begin{aligned}(\text{f.eks. } \pi_{Cl} &= \log P_{ow}\,(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\,(C_6H_6)\\ &= 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71).\end{aligned}$$

Ifølge sin definition gælder π-metoden navnlig for aromatisk substitution. Der findes tabeller med π-værdier for en lang række substituenter (b)(c)(d). De benyttes til beregning af log P_{ow} for aromatiske molekyler og delstrukturer.

Rekkers metode

Efter Rekker (g) beregnes værdien af log P_{ow} således:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i\, f_i + \sum_j (\text{vekselvirkningsudtryk})$$

hvor f_i er de forskellige molekylfragmentkonstanter og a_i er den hyppighed, hvormed de forekommer i det pågældende molekyle. Korrektionsudtrykkene kan udtrykkes som et heltalsmultiplum af én enkelt konstant C_m (den såkaldte »magiske konstant«). Fragmentkonstanterne f_i og C_m er bestemt på grundlag af en liste med 1 054 eksperimentelt bestemte værdier af P_{ow} (825 forbindelser) ved hjælp af flerdimensional regressionsanalyse (c)(h). Vekselvirkningsudtrykkene bestemmes efter faste regler, der er beskrevet i litteraturen (e)(h)(i).

Hansch-Leo's metode

Efter Hansch og Leo (c) beregnes værdien af log P_{ow} således:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i\, f_i + \sum_j b_j\, F_j$$

hvor f_i er de forskellige molekylfragmentkonstanter, F_j er korrektionsudtrykkene, og a_i og b_j er de hertil hørende hyppigheder. Ud fra eksperimentelt bestemte værdier af P_{ow} har man ved at prøve sig frem kunnet opstille en liste over atom- og gruppefragmentværdier og en liste over korrektionsudtryk F_j (såkaldte »faktorer«). Korrektionsudtrykkene er ordnet i flere forskellige klasser (a)(c). Det er forholdsvis kompliceret og tidkrævende at tage hensyn til alle regler og korrektionsudtryk. Der er udviklet edb-programmer hertil (b).

Kombineret metode

Beregningen af log P_{ow} for komplekse molekyler kan forbedres betydeligt, hvis molekylet deles op i større delstrukturer, som man har pålidelige log P_{ow}-værdier for, enten fra tabeller (b)(c) eller fra egne målinger. Sådanne fragmenter (f.eks. heterocykliske forbindelser, anthraquinon, azobenzen) kan dernæst kombineres med Hansch's π-værdier eller Rekkers eller Leo's fragmentkonstanter.

Bemærkninger

i) Beregningsmetoderne kan kun anvendes på helt eller delvis ioniserede forbindelser, hvis de nødvendige korrektionsfaktorer kan tages i betragtning.

ii) Hvis der må antages at forekomme intramolekylære hydrogenbindinger, må det hertil svarende korrektionsudtryk (ca. + 0,6 til + 1,0 log P_{ow}-enheder) lægges til (a). Rumlige modeller og spektroskopiske data kan afsløre, om der kan være tale om sådanne bindinger i molekylet.

iii) Hvis flere tautomere former er mulige, benyttes den mest sandsynlige form som grundlag for beregningen.

iv) Man skal nøje følge med i revisioner af lister over fragmentkonstanter.

Rapport

Ved anvendelse af beregningsmetoder skal testrapporten om muligt indeholde følgende oplysninger:

— beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— angivelse af alle muligheder for intramolekylære hydrogenbindinger, dissociation, ladning eller andre særlige forhold (f.eks. tautomeri)

— beskrivelse af beregningsmetoden

— identifikation af de anvendte datas oprindelse

— særlige valg af fragmenter

— udtømmende dokumentation af beregningen.

LITTERATURHENVISNINGER

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

Tillæg 2

Anbefalede referencestoffer til HPLC-metoden

nr.	referencestof	log P_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-acetylpyridin	0,5	
3	anilin	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	p-methoxyphenol	1,3	pKa = 10,26
7	phenoxyeddikesyre	1,4	pKa = 3,12
8	phenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrophenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	phenylacetonitril	1,6	
12	4-methylbenzylalkohol	1,6	
13	acetophenon	1,7	
14	2-nitrophenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobenzoesyre	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzen	1,9	
18	kanelalkohol	1,9	
19	benzoesyre	1,9	pKa = 4,19
20	p-cresol	1,9	pKa = 10,17
21	kanelsyre	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	methylbenzoat	2,1	
24	benzen	2,1	
25	3-methylbenzoesyre	2,4	pKa = 4,27
26	4-chlorphenol	2,4	pKa = 9,1
27	trichlorethylen	2,4	
28	atrazin	2,6	
29	ethylbenzoat	2,6	
30	2,6-dichlorbenzonitril	2,6	
31	3-chlorbenzoesyre	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	1-naphthol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dichloranilin	2,8	
35	chlorbenzen	2,8	
36	allylphenylether	2,9	
37	brombenzen	3,0	
38	ethylbenzen	3,2	
39	benzophenon	3,2	
40	4-phenylphenol	3,2	pKa = 9,54
41	thymol	3,3	
42	1,4-dichlorbenzen	3,4	
43	diphenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	naphthalen	3,6	
45	phenylbenzoat	3,6	
46	isopropylbenzen	3,7	
47	2,4,6-trichlorphenol	3,7	pKa = 6
48	biphenyl	4,0	
49	benzylbenzoat	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec-butylphenol	4,1	
51	1,2,4-trichlorbenzen	4,2	
52	dodecansyre	4,2	
53	diphenylether	4,2	
54	n-butylbenzen	4,5	
55	phenanthren	4,5	
56	fluoranthen	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6-diphenylpyridin	4,9	
59	triphenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Andre referencestoffer med lav log P_{ow}		
1	nikotinsyre	– 0,07	

A.9. FLAMMEPUNKT

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets brændbarhed. Metoden kan anvendes for væsker, hvis dampe kan antændes af en antændelseskilde. De opregnede testmetoder er kun pålidelige i de flammepunktsintervaller, der er anført ved de enkelte metoder.

Ved valg af metode skal det tages med i overvejelserne, om der kan ske en kemisk reaktion mellem stoffet og testbeholderen.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Flammepunktet er den laveste temperatur, korrigeret til et tryk på 101,325 kPa, ved hvilken en væske under de i metoden fastsatte betingelser udvikler dampe i en sådan mængde, at de danner en brændbar blanding med luft i testbeholderen.

Enheder: °C

$t = T - 273{,}15$

(t er i °C og T er i K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet anbringes i en testbeholder og opvarmes eller afkøles til testtemperaturen efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i den enkelte testmetode. Der udføres antændelsesforsøg til konstatering af, om prøven antændes ved testtemperaturen eller ikke.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhed**

Repeterbarheden varierer alt efter flammepunktsområdet og den anvendte metode; højst 2 °C.

1.5.2. **Følsomhed**

Følsomheden afhænger af den anvendte testmetode.

1.5.3. Specificitet

Nogle af testmetoderne er begrænset til et bestemt flammepunktsinterval, og deres specificitet afhænger af andre stofegenskaber (f.eks. høj viskositet).

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Der anbringes en prøve af stoffet i testapparatet efter 1.6.3.1 og/eller 1.6.3.2.

Af sikkerhedshensyn anbefales det, at der kun anvendes en lille test, dvs. ca. 2 cm^3, af energirige og giftige stoffer.

1.6.2. **Testbetingelser**

For så vidt som det er foreneligt med sikkerhedskravene, skal apparatet anbringes et trækfrit sted.

1.6.3. **Udførelse af testen**

1.6.3.1. *Ligevægtsmetoden*

Se ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 og ISO 3679.

1.6.3.2. *Ikke-ligevægtsmetoden*

Abel apparat:

Se BS 2000 part 170, NF M07-011 og NF T66-009.

Abel-Pensky apparat:

Se EN 57, DIN 51755 part 1 (for temperaturer fra 5 °C til 65 °C), DIN 51755 part 2 (for temperaturer under 5 °C) og NF M07-036.

Tag apparat:

Se ASTM D 56.

Pensky-Martens apparat:

Se ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 og NF M07-019.

Bemærkninger:

Hvis der ved en ikke-ligevægtsmetode i 1.6.3.2 findes et flammepunkt på 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C eller 55 ± 2 °C, skal det bekræftes ved en ligevægtsmetode med samme apparat.

Til anmeldelsesformål kan der kun bruges metoder, der giver flammepunktstemperaturen.

Til bestemmelse af flammepunktet af tyktflydende opløsningsmiddelholdige væsker (maling, lim og lignende) må der kun benyttes apparater og testmetoder, der er egnede til bestemmelse af tyktflydende væskers flammepunkt.

Se ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 og DIN 53213 part 1.

2. DATA

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— angivelse af den anvendte metode samt eventuelle afvigelser herfra

— resultaterne og supplerende bemærkninger af betydning for vurdering af dem.

4. LITTERATURHENVISNING

Ingen.

A.10. ANTÆNDELIGHED (FASTE STOFFER)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets eventuelle eksplosive egenskaber.

Testen udføres kun på stoffer, der foreligger som pulver, granulat eller pasta.

For ikke at medtage alle stoffer, der kan antændes, men kun dem, der brænder hurtigt eller på en måde, der er særlig farlig, anses kun de stoffer, hvis forbrændingshastighed overstiger en vis værdi, for at være let antændelige.

Det kan være særlig farligt, hvis forglødning kan fortsætte gennem metalpulver, da en brand er vanskelig at slukke. Metalpulver, hvori forglødningen kan udbrede sig i et bestemt tidsrum, anses for let antændelige.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Forbrændingstiden udtrykkes i sekunder.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet anbringes i en ca. 250 mm lang ubrudt stribe, og der foretages en indledende screeningstest til bestemmelse af, om der efter antænding med en gasflamme sker en forbrænding, der breder sig med åben flamme eller ved glødning. Hvis forbrændingen breder sig mere end 200 mm hen ad striben i løbet af et bestemt tidsrum, udføres der et komplet testprogram til bestemmelse af forbrændingshastigheden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. Indledende screeningprøve

Stoffet anbringes på en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade i en ca. 250 mm lang, 20 mm bred og 10 mm høj ubrudt stribe. En gasflamme (mindste diameter 5 mm) holdes hen til den ene ende af striben, indtil pulveret bryder i brand, dog højst 2 minutter (5 minutter for pulver af metal og metallegeringer). Det noteres, om forbrændingen breder sig 200 mm hen ad striben i løbet af testperioden på 4 minutter (40 minutter for metalpulver). Hvis stoffet ikke bryder i brand eller forbrændingen ikke med åben flamme eller ved glødning breder sig 200 mm hen ad striben i løbet af testperiodens 4 minutter (40 minutter), anses stoffet ikke for at være let antændeligt, og yderligere testning er ikke påkrævet. Hvis forbrændingen i stoffet breder sig 200 mm hen ad striben på mindre end 4 minutter eller mindre end 40 for metalpulver, gennemføres nedenstående test (1.6.2).

1.6.2. **Test af forbrændingshastigheden**

1.6.2.1. *Forberedelse*

Stoffer, der foreligger som pulver eller granulat, fyldes løst i en 250 mm lang form, der har trekantet tværsnit med indvendig højde 10 mm og bredde 20 mm. På hver side af formen i længderetningen er der anbragt en metalplade, der rager 2 mm op over det trekantede tværsnits overkant (se figuren). Derefter lader man tre gange formen falde ned på et fast underlag fra 2 cm's højde. Om nødvendigt fyldes formen op igen. Sidestykkerne fjernes, og overskydende materiale skrabes af. Der lægges en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade oven på formen, det hele vendes om, og formen fjernes.

Pasta-agtige stoffer bredes ud på en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade i en 250 mm lang pølse med et tværsnit på ca. 1 cm^2.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Er stoffet følsomt over for fugt, gennemføres testen så hurtigt som muligt efter, at stoffet er taget ud af beholderen.

1.6.2.3. *Udførelse af prøvningen*

Volden anbringes i et stinkskab på tværs af luftstrømmen.

Lufthastigheden skal være tilstrækkelig til at forhindre, at røgen slipper ud i laboratoriet, og må ikke ændres under prøvningen. Omkring apparatet opstilles der en skærm til beskyttelse mod træk.

Volden antændes i den ene ende med en gasflamme (diameter mindst 5 mm). Når forbrændingen har forplantet sig 80 mm, måles udbredelseshastigheden over de næste 100 mm. Testen udføres 6 gange, hver gang med en ren kold plade, medmindre der observeres et positivt resultat tidligere.

2. DATA

Forbrændingstiden fra den indledende screeningstest (1.6.1) og den korteste forbrændingstid i op til 6 tests (1.6.2.3) er relevante for vurderingen.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— en nøjagtig beskrivelse af det testede stof, dets fysiske tilstandsform og dets fugtindhold

— resultaterne af den indledende screeningstest og af testen af forbrændingshastigheden, hvis den er udført

— alle yderligere bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Stoffer, der foreligger i form af pulver, granulat eller pasta, anses for at være let antændelige, hvis forbrændingstiden i nogen af de tests, der er udført efter 1.6.2, er mindre end 45 sekunder. Pulver af metal eller en metallegering anses for at være let antændeligt, hvis det kan antændes og flammen eller reaktionszonen forplanter sig over hele testen på 10 minutter eller derunder.

4. LITTERATURHENVISNING

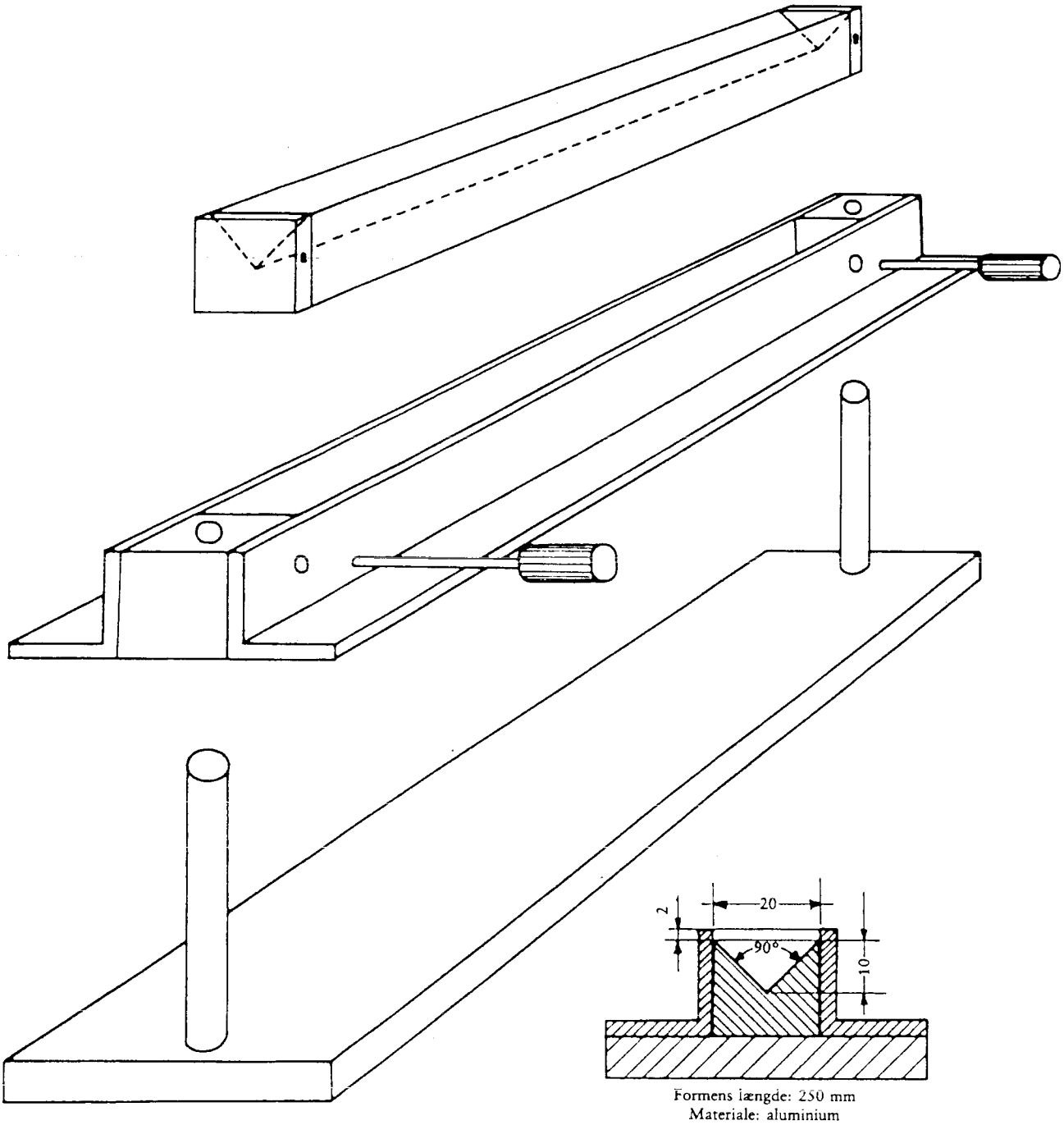
(1) NF T 20-042 (sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Tillæg

Figur

Form og tilbehør til fremstilling af volden

(alle mål i millimeter)



Formens længde: 250 mm
Materiale: aluminium

A.11. ANTÆNDELIGHED (GASSER)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Med denne metode kan det bestemmes, om en gas blandet med luft ved stuetemperatur (ca. 20 °C) og atmosfæretryk kan antændes, og i så fald i hvilket koncentrationsområde. Blandinger med stigende koncentrationer af prøvegasssen med luft påvirkes med en elektrisk gnist, og det iagttages, om der sker antændelse.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Området for antændelighed er koncentrationsområdet mellem den nedre og den øvre eksplosionsgrænse. Nedre og øvre eksplosionsgrænse er de koncentrationsgrænser for den antændelige gas i blanding med luft, ved hvilke der ikke sker nogen flammeudbredelse.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Koncentrationen af gassen i luft øges trinvis, og blandingen påvirkes ved hvert trin med en elektrisk gnist.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. Apparatur

Testbeholderen er en opretstående glascylinder med en indre diameter på mindst 50 mm og en højde på mindst 300 mm. Antændelseselektroderne er placeret 60 mm over cylinderens bund med en indbyrdes afstand på 3 til 5 mm. Cylinderen er forsynet med en trykaflastningsåbning. Apparatet skal afskærmes, så eventuelle eksplosionsskader begrænses.

Som antændelseskilde anvendes en stående induktionsgnist med en varighed på 0,5 sek. Den dannes af en højspændingstransformator med en sekundærspænding på 10 til 15 kV (største tilførte effekt 300 W). I reference (2) er der vist et eksempel på et egnet apparat.

1.6.2. Testbetingelser

Testen skal udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.3. Udførelse af testen

Ved hjælp af doseringspumper ledes en gas/luftblanding med kendt koncentration ind i glascylinderen. Blandingen påvirkes med en gnistudladning, og det iagttages, om der ved antændelseskilden opstår en flamme, som forplanter sig af sig selv. Gaskoncentrationen varieres i intervaller på 1 vol. %, indtil der sker antændelse som beskrevet ovenfor.

Hvis det ud fra kendskab til gassens kemiske struktur må formodes, at gassen ikke kan antændes, og sammensætningen af den støkiometriske blanding med luft kan beregnes, behøver man kun at afprøve blandinger fra 10 % under til 10 % over det støkiometriske blandingsforhold.

2. DATA

Den eneste information, der er relevant for bestemmelse af denne egenskab er, om der forekommer flammeudbredelse.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— beskrivelse af det anvendte apparat med angivelse af dimensioner

— den temperatur, som testen er udført ved

— de afprøvede koncentrationer og de opnåede resultater

— testens resultat: ikke-antændelig eller let antændelig gas

— konkluderes det, at gassen er ikke-antændelig, anføres det koncentrationsområde, hvor prøvning med 1 % intervaller har fundet sted

— alle oplysninger og bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. »Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen«. Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126-127.

A.12. ANTÆNDELIGHED (KONTAKT MED VAND)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Denne testmetode kan anvendes til bestemmelse af, om et stof ved reaktion med vand udvikler farlige mængder gas, der eventuelt er let antændelig.

Testmetoden kan anvendes til både væsker og faste stoffer. Den kan ikke anvendes til stoffer, der spontant bryder i brand, når de kommer i kontakt med luften.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Let antændelig: stoffer, som ved kontakt med vand eller fugtig luft udvikler let antændelige gasser i farlige mængder, dvs. mindst 1 liter/kg pr. time.

1.3. METODENS PRINCIP

Testen foregår trinvis som beskrevet nedenfor; testen kan afbrydes, når der sker antænding. Hvis det vides, at stoffet ikke reagerer voldsomt med vand, kan man begynde med trin 4 (1.3.4).

1.3.1. Trin 1

Teststoffet anbringes i et kar med destilleret vand ved 20 °C, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand.

1.3.2. Trin 2

Teststoffet anbringes på et stykke filtrerpapir, der flyder på overfladen i en skål med destilleret vand ved 20 °C, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand. Filtrerpapiret tjener udelukkende til at holde stoffet samlet på ét sted for at øge chancerne for antændelse.

1.3.3. Trin 3

Teststoffet arrangeres i en ca. 2 cm høj bunke med en diameter på ca. 3 cm. Der tilsættes et par dråber vand til bunken, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand.

1.3.4. Trin 4

Teststoffet blandes med destilleret vand ved 20 °C, og gasudviklingens hastighed måles hver time over en periode på 7 timer. Hvis hastigheden efter 7 timer er uregelmæssig eller stigende, forlænges måleperioden, dog højst til 5 dage. Testen kan afbrydes, hvis hastigheden på noget tidspunkt overstiger 1 liter/kg pr. time.

1.4. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

1.6.1. **Trin 1**

1.6.1.1. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.1.2. *Udførelse af testen*

En lille mængde af teststoffet (ca. 2 mm i diameter) anbringes i et kar med destilleret vand. Det noteres, (i) om der udvikles gas, og (ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

1.6.2. **Trin 2**

1.6.2.1. *Apparatur*

Et stykke filtrerpapir anbringes fladt flydende på overfladen af destilleret vand i en egnet beholder, f.eks. en afdampningsskål med en diameter på 100 mm.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.2.3. *Udførelse af testen*

En lille mængde af teststoffet (ca. 2 mm diameter) anbringes midt på filtrerpapiret. Det noteres, (i) om der udvikles gas, og (ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

1.6.3. **Trin 3**

1.6.3.1. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.3.2. *Udførelse af testen*

Teststoffet anbringes i en ca. 2 cm høj bunke på ca. 3 cm i diameter med en fordybning i toppen. Der anbringes et par dråber vand i fordybningen, og det noteres, (i) om der udvikles gas, og (2) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

1.6.4. **Trin 4**

1.6.4.1. *Apparatur*

Der anvendes et apparat som vist på figuren.

1.6.4.2. *Testbetingelser*

Det undersøges visuelt, om beholderen med teststof indeholder pulver på under 500 µm (partikelstørrelse). Hvis pulver udgør mere end 1 % (w/w) af den samlede prøve eller prøven er smuldrende, formales hele testen til pulver inden testen, så der tages hensyn til reduktion af partikelstørrelsen under opbevaring og håndtering; i alle andre tilfælde undersøges testen i den stand, hvori den er modtaget. Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C) og atmosfæretryk.

1.6.4.3. *Udførelse af testen*

Der anbringes 10 — 20 ml vand i apparatets tildrypningstragt og 10 g stof i den koniske kolbe. Den udviklede gasmængde kan måles ved enhver egnet metode. Tildrypningstragtens hane åbnes, så vandet løber ned i kolben, og et stopur startes. Gasudviklingen måles hver time over en periode på 7 timer. Hvis gasudviklingen er uregelmæssig i denne periode eller stiger hen mod periodens slutning, fortsættes målingerne i op til 5 døgn. Hvis gasudviklingen på noget tidspunkt kommer over 1 liter/kg pr. time, kan testen afbrydes. Testen gentages yderligere to gange.

Hvis gassens kemiske sammensætning ikke er kendt, foretages der en analyse af den. Hvis gassen indeholder let antændelige bestanddele, og det ikke vides, om hele blandingen er let antændelig, fremstilles der en blanding med samme sammensætning, som tests efter metode A.11.

2. DATA

Stoffet anses for farligt, hvis

— det spontant bryder i brand på noget trin af testen

eller

— der udvikles brændbar gas i større mængde end 1 liter/kg pr. time.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— eventuel forbehandling af teststoffet

— resultatet af testen (trin 1, 2, 3 og 4)

— den udviklede gas' kemiske sammensætning

— gasudviklingshastigheden, hvis trin 4 (1.6.4) udføres

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. LITTERATURHENVISNINGER

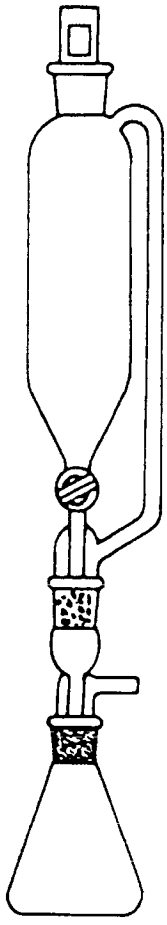
(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

Tillæg

Figur

Apparatur



A.13 VÆSKERS OG FASTE STOFFERS PYROFORISKE EGENSKABER

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Testmetoden kan anvendes for væsker og faste stoffer, der i små mængder spontant bryder i brand kort tid efter at være kommet i kontakt med luften ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

Stoffer, der skal udsættes for luftens påvirkning i flere dage eller timer ved stuetemperatur, førend der sker antændelse, omfattes ikke af denne testmetode.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Stoffer anses for at være selvantændelige, hvis de bryder i brand eller forkuller under betingelserne i 1.6.

Det kan også være påkrævet at undersøge væskers selvantændelse med metode A.15 Selvantændelsestemperatur (væsker og gasser).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet, fast eller flydende, blandes med en inaktiv bærer og bringes i kontakt med luften ved stuetemperatur i 5 minutter. Væsker, der ikke bryder i brand, absorberes dernæst på filtrerpapir og udsættes for luftens påvirkning ved omgivende temperatur (ca. 20 °C) i 5 minutter. Flydende og faste stoffer, der bryder i brand, og væsker, der bryder i brand eller får filtrerpapiret til at forkulle, anses for at være selvantændelige.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarhed: på grund af den sikkerhedsmæssige betydning er et enkelt positivt resultat tilstrækkeligt til, at stoffet anses for selvantændeligt.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. Apparatur

Der fyldes et ca. 5 mm tykt lag diatoméjord i en porcelænsskål med en diameter på ca. 10 cm ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

Bemærk:

Diatoméjord eller et andet tilsvarende inaktivt stof, som er let at få fat i, antages at repræsentere den jord, som teststoffet kunne blive spildt på i tilfælde af uheld.

Der behøves tørt filtrerpapir til test af væsker, som ikke bryder i brand ved kontakt med luften, når de er blandet med et inaktivt bæremateriale.

1.6.2. **Udførelse af testen**

a) *Faste stoffer i pulverform*

Fra en højde af ca. 1 m hældes 1-2 cm af pulveret ned på en ikke-brændbar flade, og det iagttages, om stoffet bryder i brand under faldet eller inden for 5 minutter derefter.

Testen udføres 6 gange, medmindre der sker antændelse.

b) *Væsker*

Ca. 5 cm^3 af testvæsken hældes ud i den klargjorte porcelænsskål, og det iagttages, om stoffet bryder i brand, inden der er gået 5 minutter.

Hvis der ikke sker antændelse i nogen af de seks forsøg, udføres følgende forsøg:

Med en injektionssprøjte sprøjtes 0,5 ml af prøven ud på et bøjet stykke filtrerpapir, og det iagttages, om der inden for 5 minutter sker antændelse eller forkulning af filtrerpapiret. Forsøget udføres 3 gange medmindre der sker antændelse eller forkulning.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Testen kan afbrydes, så snart et af forsøgene giver positivt resultat.

2.2 EVALUERING

Hvis stoffet bryder i brand inden 5 minutter efter, at det er tilsat til en inaktiv bærer og blevet udsat for luftens påvirkning, eller hvis en væske får et stykke filtrerpapir til at forkulle eller bryde i brand, inden 5 minutter efter at stoffet er tilsat og blevet udsat for luftens påvirkning, anses stoffet (væsken) for at være selvantændeligt.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— resultaterne af testen

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York

A.14. EKSPLOSIVE EGENSKABER

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Metoden indeholder et testsystem til bestemmelse af, om et fast eller pastaagtigt stof frembyder eksplosionsfare, når det udsættes for påvirkning med en flamme (varmefølsomhed) eller ved slag eller friktion (følsomhed over for mekanisk påvirkning), og om en væske frembyder eksplosionsfare, når den udsættes for påvirkning med en flamme eller ved slag.

Metoden består af tre dele:

a) en test for varmefølsomhed (1)

b) en test for følsomhed over for slagpåvirkning (1)

c) en test for følsomhed over for friktionspåvirkning (1).

Metoden giver data til vurdering af sandsynligheden for, at der ved visse almindelige påvirkninger fremkaldes en eksplosion. Metoden tilsigter ikke at fastslå, om stoffet overhovedet kan bringes til at eksplodere.

Metoden er egnet til bestemmelse af, om et stof frembyder en eksplosionfare (varmefølsomhed og mekanisk følsomhed) under de særlige betingelser, der er specificeret i direktivet. Metoden er baseret på en række apparattyper, som i vidt omfang anvendes internationalt (1), og som sædvanligvis giver brugbare resultater. Det erkendes, at metoden ikke er definitiv. Der kan benyttes andet apparatur end det specificerede, forudsat at det er internationalt anerkendt, og at de fundne resultater kan korreleres til resultater opnået med det specificerede apparatur.

Testen behøver ikke at udføres, hvis det på grundlag af foreliggende termodynamiske oplysninger (f.eks. dannelsesvarme eller dekomponeringsvarme) og/eller en strukturformel, hvori visse reaktive grupper (2) ikke indgår, må anses for hævet over enhver rimelig tvivl, at stoffet er ude af stand til hurtig dekomponering ledsaget af gasudvikling eller varmefrigørelse (dvs. at stoffet ikke frembyder nogen eksplosionsfare). For væsker kræves der ikke test for friktionsfølsomhed.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Eksplosiv:

Stoffer, som kan eksplodere ved flammepåvirkning, eller som er følsomme over for slag eller friktion (eller mere følsomme over for mekanisk påvirkning end 1,3-dinitrobenzen i et alternativt apparat).

1.3. REFERENCESTOFFER

1,3-dinitrobenzen, teknisk krystallinsk produkt, sigtet på 0,5 mm sigte, til friktions- og slagpåvirkningsmetoden.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, hexogen, cyclonite — CAS121-82-4), omkrystalliseret i vandig cyclohexanon, vådsigtet på 250 µm sigte og tilbageholdt på en 150 µm sigte, tørret ved 103 ± 2 °C (i 4 timer) til anden række friktions- og slagprøvninger.

1.4. METODENS PRINCIP

Der kræves indledende testning til bestemmelse af, hvordan de tre følsomhedstests kan udføres under betryggende forhold.

1.4.1. **Test for sikker håndtering** (3)

Af sikkerhedshensyn foretages der før den egentlige test en indledende test bestående i, at en meget lille testmængde (ca. 10 mg) opvarmes fritliggende i en gasflamme, og påvirkes med slag i et passende apparat og ved friktion ved hjælp af en hammer mod en ambolt eller et andet friktionsapparat. Formålet er at fastslå, om stoffet er så følsomt og eksplosivt, at den foreskrevne følsomhedstest, især for varmefølsomhed, må udføres under iagttagelse af særlige forholdsregler, så operatøren ikke kan komme til skade.

1.4.2. **Varmefølsomhed (virkningen af en flamme)**

Metoden består i opvarmning af stoffet i et stålrør, der er lukket med en mundingsplade. Ved hjælp af mundingsplader med forskellige huldiametre kan det bestemmes, om stoffet er tilbøjeligt til at eksplodere under stærk varmepåvirkning og veldefineret indeslutningsgrad.

1.4.3. **Mekanisk følsomhed (slag)**

Metoden består i, at stoffet udsættes for et slag med et specificeret lod, der falder fra en specificeret højde.

1.4.4. **Mekanisk følsomhed (friktion)**

Metoden består i, at et fast eller pastaagtigt stof udsættes for friktion mellem standardoverflader med specificeret belastning og ved specificeret relativ bevægelse.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

1.6.1. **Varmefølsomhed (virkningen af en flamme)**

1.6.1.1. *Apparatur*

Apparaturet består af et engangsstålrør med lukkeanordning (figur 1) anbragt i en opvarmnings- og beskyttelsesanordning. Røret er af dybtrukket stålplade (se tillægget) og har en indvendig diameter på 24 mm, en længde på 75 mm og en godstykkelse på 0,5 mm. Røret har i den åbne ende en flange, så det kan lukkes med mundingspladen ved hjælp af en todelt forskruning (møtrik og krave med gevind). Mundingspladen er trykmodstandsdygtig og har et hul i midten. Møtrikken og kraven med gevind er fremstillet i chrom-manganstål (se tillægget), som er gnistfrit op til 800 °C. Der foreligger mundingsplader med en række forskellige huldiametre, som er fremstillet i 6 mm tykt varmebestandigt stål (se tillægget).

1.6.1.2. *Testbetingelser*

Normalt testes stoffet i den tilstand, hvori det er modtaget, men i visse tilfælde, f.eks. hvis det foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, kan det være nødvendigt at knuse stoffet før testen.

For faste stoffer bestemmes den mængde materiale, der skal anvendes til testen, ved en to-trins procedure. Først fyldes der i et tareret rør 9 cm af stoffer, som nedstampes med en kraft på 80 N fordelt over hele rørtværsnittet. Af sikkerhedshensyn eller i tilfælde, hvor stoffet kan ændre fysisk form ved kompression, kan der benyttes

andre påfyldningsmetoder; eksempelvis er stampning ikke egnet, hvis stoffet er meget friktionsfølsomt. Hvis materialet kan komprimeres, tilsættes der mere og stampes, indtil røret er fyldt til en højde af 55 mm fra overkanten. Den samlede mængde, der er brugt til fyldning af røret til denne højde, bestemmes, og der tilsættes endnu 2 portioner, som stampes med en kraft på 80 N. Der tilsættes materiale med stampning eller fjernes materiale, så røret er fyldt til 15 mm fra overkanten. Det andet trin foregår ved, at der først tilsættes og stampes en tredjedel af den samlede mængde, der blev brugt til det første trin. Der tilsættes endnu 2 portioner med stampning med 80 N, og materialets højde i røret justeres til 15 mm fra overkanten ved tilsætning eller fjernelse af materiale. Til hvert forsøg anvendes den mængde fast stof, der er fundet ved dette andet trin; påfyldningen sker i 3 lige store portioner, der hver komprimeres til 9 cm^3 med den fornødne kraft. (Dette gøres lettest ved anvendelse af afstandsringe.)

Væsker og geler fyldes i røret til en højde af 60 mm, idet det for gelernes vedkommende nøje påses, at der ikke dannes luftbobler. Kraven med gevind føres op om røret nedefra, den valgte mundingsplade indsættes, og møtrikken strammes efter smøring med et molybdænsulfidbaseret smøremiddel. Det er yderst vigtigt at kontrollere, at der hverken har sat sig stof mellem flangen og pladen eller i gevindet.

Opvarmningen sker med propan, der fra en industriel trykflaske med trykregulator (60-70 mbar) ledes gennem en måler og fordeles ligeligt til fire brændere gennem en manifold (hvilket kontrolleres ved visuel inspektion af brændernes flammer). Brænderne er placeret omkring prøvekammeret som vist på figur 1. De fire brænderes samlede forbrug er på ca. 3,2 liter propan pr. minut. Der kan anvendes andre brændstoffer og brændere, men opvarmningshastigheden skal være som specificeret i figur 3. Uanset det anvendte apparatur skal opvarmningshastigheden regelmæssigt kontrolleres med dibutylphthalatfyldte rør, som vist på figur 3.

1.6.1.3. *Udførelse af testene*

Hver test varer, indtil røret enten sønderdeles eller røret har været opvarmet i 5 minutter. En test, hvorved røret sønderdeles i tre eller flere fragmenter, som eventuelt hænger sammen med smalle metalstrimler som vist på figur 2, vurderes som en eksplosion. En test, der fører til færre fragmenter eller ingen fragmentering, betragtes ikke som en eksplosion.

Der udføres først tre tests med en mundingsplade med et 6 mm hul, og opnås der ingen eksplosion, udføres endnu tre tests med en mundingsplade med et 2 mm hul. Finder der eksplosion sted under én af disse forsøgsrækker, er yderligere testning ikke påkrævet.

1.6.1.4. *Evaluering*

Testens resultat anses for positivt, hvis der sker eksplosion i én af ovennævnte forsøgsrækker.

1.6.2. **Mekanisk følsomhed (slag)**

1.6.2.1. *Apparatur (figur 4)*

Hoveddelene af et typisk faldhammerapparat er en støbt stålblok med bundplade, ambolt, stander, styr, faldlodder, frigørelsesmekanisme og prøveholder. Stålambolten på 100 mm (diameter) × 70 mm (højde) er skruet fast oven på en stålblok på 230 mm (længde) × 250 mm (bredde) × 200 mm (højde) med støbt bundplade på 450 mm (længde) × 450 mm (bredde) × 60 mm (højde). En stander bestående af et sømløst trukket stålrør er fastgjort i en holder, der er fastskruet bag på stålblokken. Apparatet er forankret til en massiv betonklods på 60 × 60 × 60 cm med fire skruer, så styrene er fuldstændig lodrette og faldlodderne kan falde frit. Der findes lodder på 5 og 10 kg fremstillet i massivt stål. Loddernes slaghoved er af hærdet stål, HRC 60 til 63, og har en diameter på mindst 25 mm.

Testen er indeholdt i en slaganordning bestående af to massive stålcylindre anbragt koaksialt over hinanden i en hul cylindrisk styrering af stål. Stålcylindrene skal have en diameter på 10 (– 0,003, – 0,005) mm og en højde på 10 mm og have polerede endeflader, afrundede kanter (krumningsradius 0,5 mm) og en hårdhed på HRC 58 til 65. Den hule cylinder skal have en udvendig diameter på 16 mm, en poleret udboring på 10 (+ 0,005, + 0,010) mm og en højde på 13 mm. Slaganordningen samles på en mellemambolt (diameter 26 mm, højde 26 mm) af stål og centreres med en ring, hvori der er huller til bortledning af eksplosionsprodukterne.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testvolumenet skal være på 40 mm eller det volumen, der passer til et alternativt apparat. Faste stoffer testes i tør tilstand og forberedes således:

a) stoffer i pulverform sigtes (0,5 mm sigte); alt hvad der passerer gennem sigten bruges til testen

b) stoffer, der foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, findeles og sigtes; sigtefraktionen fra 0,5 mm til 1 mm diameter bruges til testen og skal være repræsentativ for det oprindelige stof.

Stoffer, som normalt forekommer i pastaform skal om muligt testes i tør tilstand og under alle omstændigheder efter fjernelse af størst mulig mængde opløsningsmiddel. Ved test af væsker er der en afstand på 1 mm mellem den øverste og den nederste stålcylinder.

1.6.2.3. *Udførelse af testen*

Der udføres seks forsøg, hvor 10 kg's loddet falder fra en højde af 0,40 m (40 J). Forekommer der eksplosion i et af de 6 forsøg med 40 J, udføres der en ny række på seks forsøg, hvor et 5 kg's lod falder fra en højde af 0,15 m (7,5 J). I andre apparater sammenlignes prøven med det valgte referencestof ved hjælp af en fastlagt procedure (f.eks. up-and-down teknik).

1.6.2.4. *Evaluering*

Testresultatet anses for positivt, hvis der sker eksplosion (opflamning og knald betragtes som eksplosion) i mindst ét af forsøgene med det specificerede slagapparat, eller hvis prøven er mere følsom end 1,3-dinitrobenzen eller RDX i en alternativ slagtest.

1.6.3. **Mekanisk følsomhed (friktion)**

1.6.3.1. *Apparatur (figur 5)*

Friktionsapparatet består af en støbt bundplade af stål, hvorpå friktionsanordningen er monteret. Den består af en fastsiddende porcelænsstift og en bevægelig porcelænsplade. Porcelænspladen fastholdes i en slæde, der glider på to styr. Slæden er via en forbindelsesstang, en krumtap og et passende gear forbundet med en elmotor, således at porcelænspladen bevæges 10 mm frem og tilbage under porcelænsstiften én gang. Porcelænsstiften kan belastes f.eks. med 120 eller 360 newton.

Porcelænspladerne er flade og er fremstillet af hvidt teknisk porcelæn (ruhed 9 til 32 µm) og har dimensionerne 25 mm (længde) × 25 mm (bredde) × 5 mm (højde). Den cylindriske porcelænsstift, der ligeledes er fremstillet af hvidt teknisk porcelæn, har en længde på 15 mm, en diameter på 10 mm og ru kugleformede endeflader med en krumningsradius på 10 mm.

1.6.3.2. *Testbetingelser*

Prøvevolumenet skal være på 10 mm^3 eller det volumen, der passer til et alternativt apparat.

Faste stoffer testes i tør tilstand og forberedes således:

a) stoffer i pulverform sigtes (0,5 mm sigte); alt hvad der passerer gennem sigten bruges til testen

b) stoffer, der foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, findeles og sigtes; sigtefraktionen < 0,5 mm diameter bruges til testen.

Stoffer, som normalt forekommer i pastaform skal om muligt testes i tør tilstand. Hvis stoffet ikke kan tørres, skal pastaen (efter fjernelse af størst mulig mængde opløsningsmiddel) testes som et 0,5 mm tykt lag med en bredde på 2 mm og en længde på 10 mm, der udlægges med en skabelon.

1.6.3.3. *Udførelse af testen*

Porcelænsstiften anbringes på prøven, og belastningen påsættes. Ved udførelse af testen skal skuremærkerne på porcelænspladen vende på tværs af bevægelsesretningen. Det må nøje påses, at stiften hviler på prøven, at der er tilstrækkeligt testmateriale under stiften, og at pladen bevæger sig korrekt under stiften. Til anbringelse af pastaagtige stoffer på pladen anvendes der en 0,5 mm tyk skabelon med et åbent felt på 2 × 10 mm. Porcelænspladen skal bevæge sig 10 mm frem og tilbage under porcelænsstiften i løbet af 0,44 sekunder. Hver del af porcelænspladen og -stiften må kun bruges én gang; de to ender af en stift kan bruges til 2 forsøg og de to flader af en plade kan hver bruges til tre forsøg.

Der udføres seks forsøg med en belastning på 360 N. Forekommer der eksplosion i et af disse seks forsøg, udføres der en ny række på seks forsøg med en belastning på 120 N. I andre apparater sammenlignes prøven med det valgte referencestof ved hjælp af en fastlagt procedure (f.eks. up-and-down teknik).

1.6.3.4. *Evaluering*

Testresultatet anses for positivt, hvis der sker eksplosion (knitren og/eller knald eller opflamning betragtes som eksplosion) i mindst ét af forsøgene med det specificerede friktionsapparat, eller hvis de tilsvarende kriterier i en alternativ friktionstest er opfyldt.

2. DATA

Principielt anses et stof for at være eksplosionsfarligt i direktivets forstand, hvis der ved testen for varme-, slag- eller friktionsfølsomhed opnås et positivt resultat.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Prøvningsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— teststoffets betegnelse, sammensætning, renhed, fugtindhold, m.v.

— prøvens fysiske tilstandsform samt oplysning om, om den er knust, findelt og/eller sigtet

— iagttagelser under testen for varmefølsomhed (f.eks. testmasse, antal fragmenter, m.v.)

— iagttagelser under testen for mekanisk følsomhed (f.eks. dannelse af væsentlige røgmængder eller fuldstændig dekomponering uden knald, flammer, gnister, knitren, m.v.)

— resultaterne af hver forsøgstype

— videnskabelig begrundelse for eventuel anvendelse af et alternativt apparat, samt godtgørelse af korrelationen mellem resultaterne med det specificerede apparat og resultaterne med et tilsvarende apparat

— nyttige bemærkninger, såsom henvisning til forsøg med lignende produkter, som kan være relevante for korrekt fortolkning af resultaterne

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkning af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING OG EVALUERING AF RESULTATERNE

I testrapporten skal alle resultater, der anses for ukorrekte, unormale eller ikke-repræsentative, nævnes. Hvis der skal ses bort fra nogle af resultaterne, skal dette forklares, og resultaterne af supplerende eller alternativ test oplyses. Kan der ikke redegøres for et unormalt resultat, skal det tages for pålydende, og stoffet skal klassificeres i overensstemmelse hermed.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and Criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 og 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

Tillæg

Eksempel på materialespecifikation for varmefølsomhedstesting (se DIN 1623)

(1) Rør: Materialespecifikation nr. 1,0336.505 g

(2) Mundingsplade: Materialespecifikation nr. 1.4873

(3) Krave med gevind og møtrik: Materialespecifikation nr. 1.3817

Figur 1

Apparat til testing for varmefølsomhed

(alle dimensioner i mm)

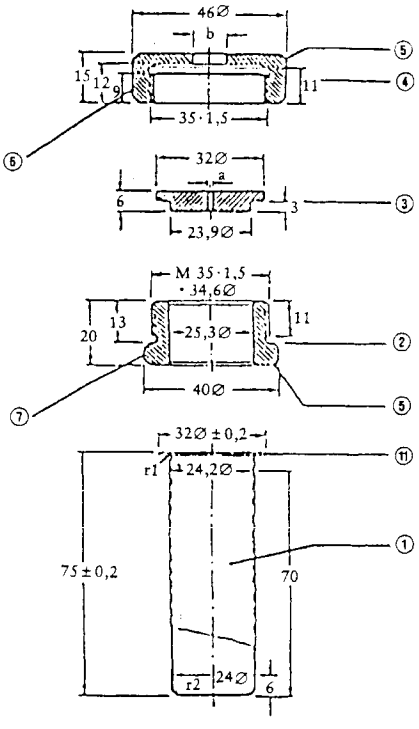


Fig. 1a Stålrør og tilbehør
(1) rør
(1a) udvendig flange
(2) krave med lavfriktionsgevind
(3) mundingsplade a = 2,0 eller 6,0 mm diameter
(4) møtrik b = 10 mm diameter
(5) rejfet kant
(6) 2 spændflader til 41 mm nøgle

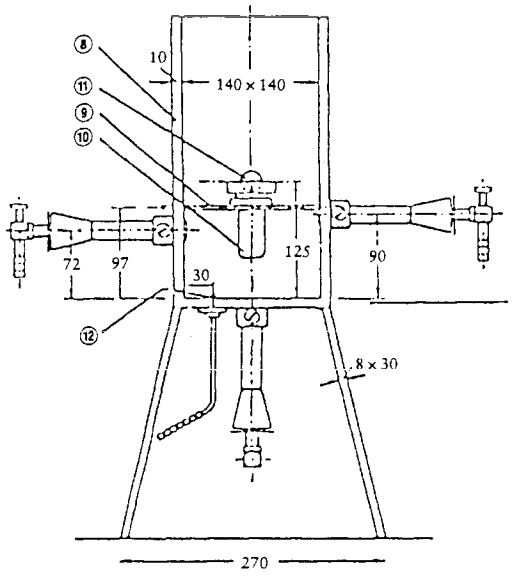
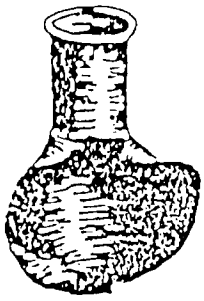


Fig. 1b Opvarmnings- og beskyttelsesanordning
(7) 2 spændflader til 36 mm nøgle
(8) sprængstyksikkert kammer
(9) 2 bærestænger til røret
(10) samlet rør
(11) bageste brænders position; de andre brændere er synlige
(12) vågeflamme

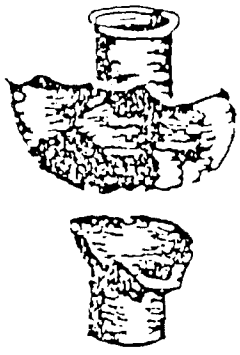
Figur 2

Test for varmefølsomhed

Eksempler på fragmentering



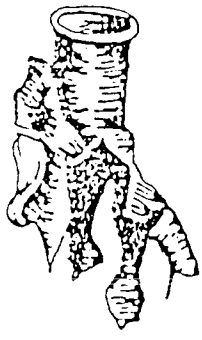
Ingen eksplosion



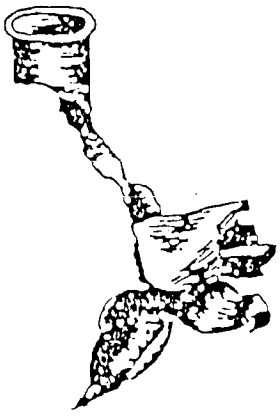
Ingen eksplosion



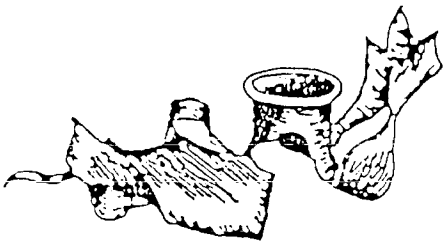
Eksplosion



Eksplosion



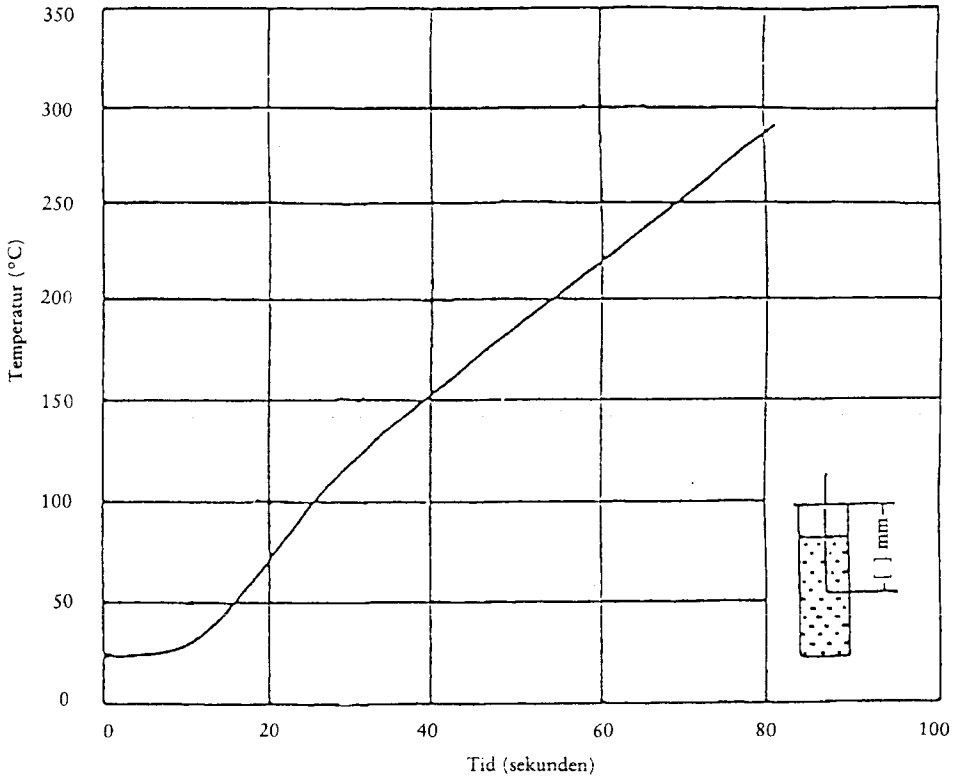
Eksplosion



Eksplosion

Figur 3

Kalibrering af opvarmningshastigheden ved test af varmefølsomhed

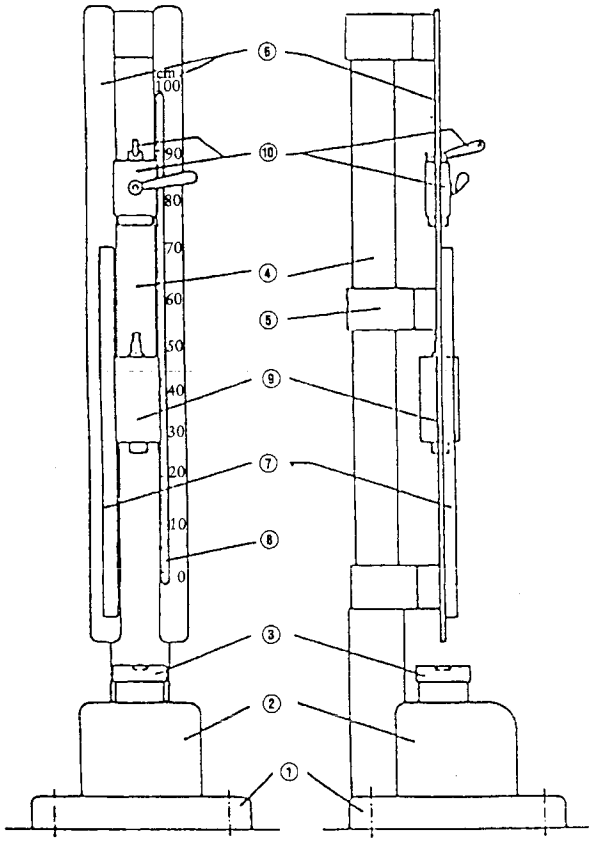


Kurve over temperaturforløbet mod tiden ved opvarmning af dibutylphthalat (27 cm^3) i et lukket rør (mundingsplade med 1,5 mm hul) med et propanflow på 3,2 liter/minut. Temperaturen er målt med chromel/alumel-termoelement med 1 mm indkapsling i rustfrit stål, anbragt centralt 43 mm under rørets overkant. Mellem 135 °C og 285 °C skal opvarmningshastigheden være 185-215 K/minut.

Figur 4

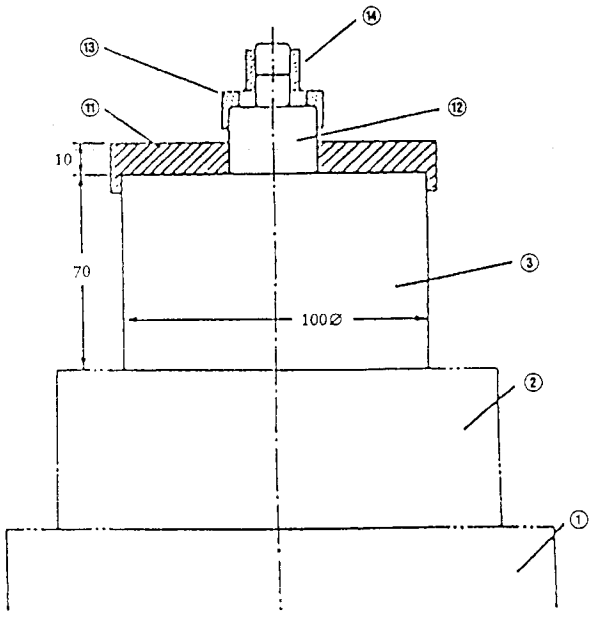
Apparat til slagprøvning

(alle dimensioner i mm)



Figur 4a. Faldhammer, forfra og fra siden, oversigtstegning

(1) bundplade, 450 × 450 × 60
(2) stålblok, 230 × 250 × 200
(3) ambolt, 100 diameter × 70
(4) stander
(5) mellemtravers
(6) 2 styr
(7) tandstang
(8) skala

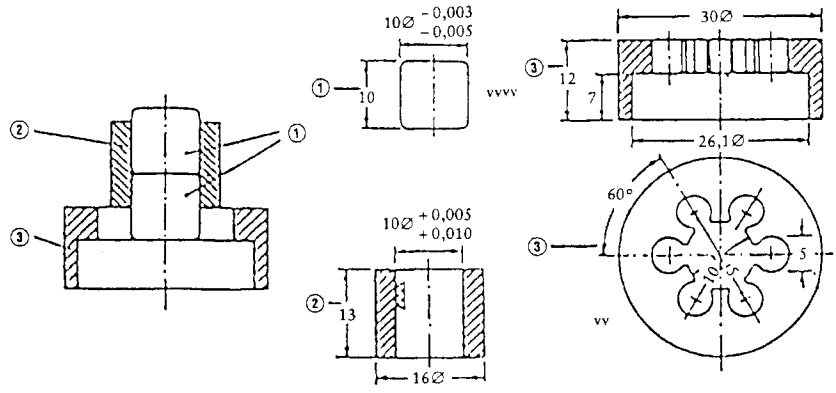


Figur 4b. Faldhammer, nederste del

(9) faldhammer (faldlod)
(10) fastholdelses- og frigørelses anordning
(11) holdeplade
(12) mellemambolt (udskiftelig)
26 diameter × 26
(13) holdering med åbninger
(14) slaganordning

Figur 4

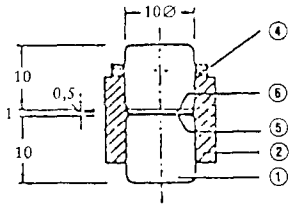
Fortsat

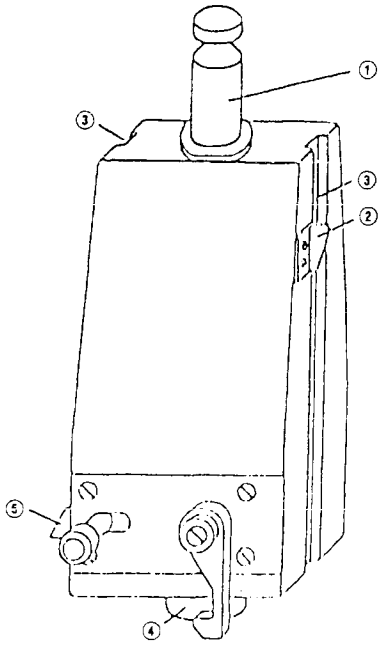


Figur 4c. Slaganordning for stoffer, der foreligger i form af pulver eller pasta

(1) stålcylindre
(2) styrering for stålcylindrene
(3) holdering med åbninger
  (a) lodret snit
  (b) plan
(4) gummiring
(5) væske (40 mm^3)
(6) væskefrit rum

Figur 4d. Slaganordning for væsker



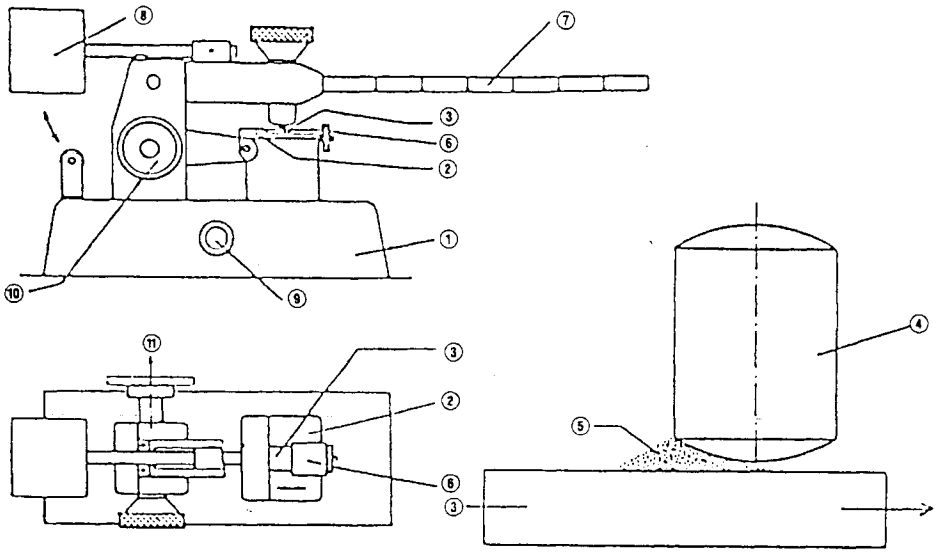


Figur 4e. Hammer (faldlod på 5 kg)

(1) ophængningstap
(2) højdemærke
(3) styrefals
(4) cylindrisk slaghoved
(5) bagslagshage

Figur 5

Apparat til friktionsfølsomhed



Figur 5a. Friktionsapparat vertikalprojektion og grundrids
(1) bundplade af stål
(2) slæde
(3) porcelænsplade 25 × 25 × 5 mm fastholdt på slæden
(4) fast porcelænsstift, 10 diameter × 15 mm
(5) prøve, ca. 10 mm^3

Figur 5b. Stiftens udgangsposition på prøven
(6) stiftholder
(7) belastningsarm
(8) kontravægt
(9) afbryder
(10) hjul til indstilling af slæden i udgangsstillingen
(11) til elmotor

A.15. SELVANTÆNDELSESTEMPERATUR FOR VÆSKER OG GASSER

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Eksplosive stoffer og stoffer, der spontant bryder i brand i kontakt med luften, underkastes ikke denne test. Testproceduren kan anvendes for gasser, væsker og dampe, som kan antændes af en hed overflade under tilstedeværelse af luft.

Selvantændelsestemperaturen kan påvirkes betydeligt i nedadgående retning af katalytiske urenheder, af overfladematerialet og af en større testbeholder.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Tendensen til selvantændelse udtrykkes ved selvantændelsestemperaturen. Selvantændelsestemperaturen er den laveste temperatur, ved hvilken teststoffet bryder i brand i blanding med luft under de i testmetoden definerede betingelser.

1.3. REFERENCESTOFFER

I standarderne (se 1.6.3) er der nævnt referencestoffer. De skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. METODENS PRINCIP

Ved metoden bestemmes den laveste temperatur af den indvendige overflade af et lukket rum, ved hvilken en gas, damp eller væske, der sprøjtes ind i rummet, bryder i brand.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheden afhænger af området for selvantændelsestemperaturen og af den anvendte testmetode.

Følsomheden og specificiteten afhænger af den anvendte testmetode.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. Apparatur

Apparaturet er beskrevet i den metode, der henvises til i 1.6.3.

1.6.2. Testbetingelser

En prøve af stoffet testes i overensstemmelse med den metode, der henvises til i 1.6.3.

1.6.3. Udførelse af testen

Se IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056 og NF T 20-037.

2. DATA

Testtemperaturen, atmosfæretrykket, den anvendte mængde prøvemateriale og tidsrummet, indtil der sker antændelse, registreres.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— den anvendte testmængde og atmosfæretrykket

— det anvendte apparatur

— måleresultaterne (testtemperatur, resultaterne af antændelsen og det hertil svarende tidsrum)

— alle yderligere oplysninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. REFERENCER

Ingen.

A.16. RELATIV SELVANTÆNDELSESTEMPERATUR FOR FASTE STOFFER

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Eksplosive stoffer og stoffer, der spontant bryder i brand i kontakt med luften, underkastes ikke denne test.

Formålet med denne test er at fremskaffe foreløbige oplysninger om faste stoffers selvantændelighed ved høj temperatur.

Hvis den varme, der udvikles enten ved stoffets reaktion med luften eller ved eksoterm dekomponering, ikke bortledes hurtigt nok til omgivelserne, sker der en opvarmning, der fører til selvantændelse. Selvantændelse kan derfor finde sted, når varmeproduktionen sker hurtigere end varmeafgivelsen.

Testmetoden egner sig til foreløbig screening af faste stoffer. Da antændelse og forbrænding af faste stoffer er meget kompleks, bør den selvantændelsestemperatur, der bestemmes ved denne metode, kun benyttes til sammenligningsformål.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den selvantændelsestemperatur, der bestemmes ved denne metode, er den laveste omgivende temperatur udtrykt i °C, hvorved en bestemt mængde af et stof bryder i brand under veldefinerede betingelser.

1.3. REFERENCESTOF

Ingen.

1.4. METODENS PRINCIP

En bestemt mængde af teststoffet anbringes i en ovn ved stuetemperatur; medens ovntemperaturen hæves med 0,5 °C/min til smeltepunktet, dog højst til 400 °C, registreres temperaturen midt i prøven som funktion af tiden. I forbindelse med denne test benævnes den ovntemperatur, ved hvilken prøvens temperatur når op på 400 °C ved selvopvarmning, selvantændelsestemperaturen.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Apparatur**

1.6.1.1. *Ovn*

En temperaturprogrammeret laboratorieovn (volumen ca. 2 liter) med fri konvektion og eksplosionsaflastning. For at imødegå enhver eksplosionsfare må eventuelle dekomponeringsgasser ikke kunne komme i berøring med varmelegemet.

1.6.1.2. *Terning af ståltrådsnet*

Et stykke ståltrådsnet med maskevidden 0,045 mm skæres ud efter tegningen i figur 1. Det foldes til terninger, hvor den ene side er åben, og fastholdes med ståltråd.

1.6.1.3. *Termoelementer*

Egnede termoelementer.

1.6.1.4. *Skriver*

En to-kanals skriver, der er kalibreret op til 600 °C eller en tilsvarende spænding.

1.6.2. **Testbetingelser**

Stoffer testes i den form, de modtages i.

1.6.3. **Udførelse af testen**

Terningen fyldes med teststoffet, og der bankes let på den under tilsætning af mere af stoffet, indtil den er helt fyldt. Dernæst ophænges terningen midt i ovnen ved stuetemperatur. Det ene termoelement anbringes midt i terningen, det andet mellem terningen og ovnvæggen til måling af ovntemperaturen.

Ovntemperaturen og prøvetemperaturen registreres løbende, mens ovntemperaturen hæves til 400 °C, dog højst til stoffets smeltepunktet, med en hastighed på 0,5 °C/min.

Antændelse af stoffet vil vise sig som en meget stejl temperaturstigning i prøven sammenlignet med ovntemperaturen.

2. DATA

Den ovntemperatur, ved hvilken prøven som følge af selvopvarmning når op på en temperatur på 400 °C, er relevant for evaluering (se figur 2).

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— en beskrivelse af teststoffet

— måleresultaterne, herunder temperatur/tid-kurven

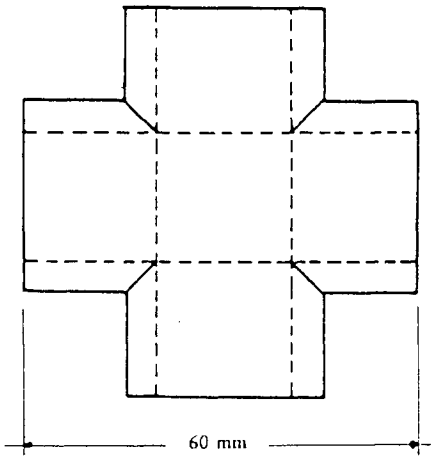
— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. REFERENCER

(1) NF T 20-036 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

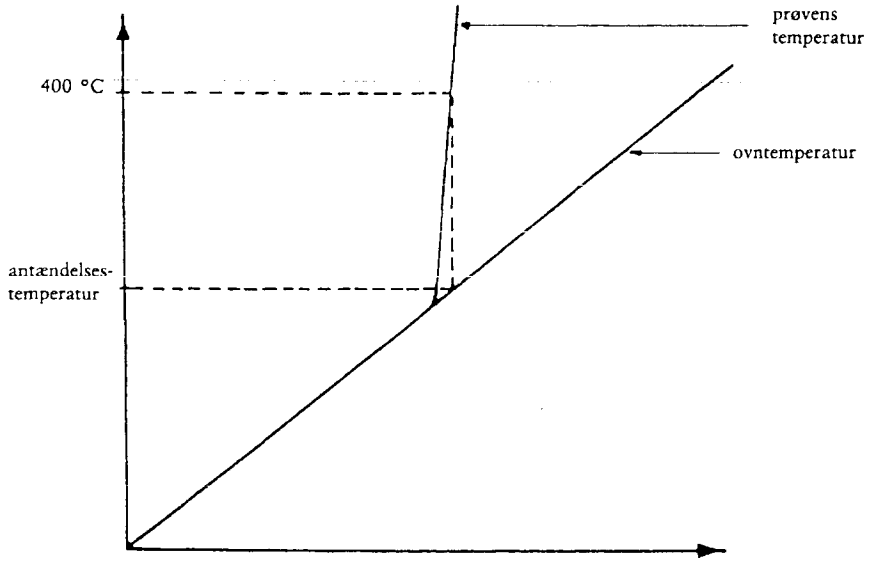
Figur 1

Tegning af 20 mm testterning



Figur 2

Typisk temperatur/tid-kurve



A.17. OXIDERENDE EGENSKABER (FASTE STOFFER)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets eventuelle eksplosive egenskaber.

Denne test kan ikke anvendes på væsker, gasser, eksplosive og yderst let antændelige stoffer samt organiske peroxider.

Det er ikke nødvendigt at udføre denne test, hvis det på grundlag af strukturformelen kan godtgøres, at stoffet med stor sandsynlighed ikke kan reagere eksotermt med et brændbart materiale.

Der udføres en indledende test til konstatering af, om den egentlige test skal udføres under iagttagelse af særlige forsigtighedsregler.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Reaktionstid: den reaktionstid i sekunder, der kræves for at reaktionszonen breder sig hen ad en vold, efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i 1.6.

Reaktionshastighed: udtrykkes i millimeter pr. sekund.

Største reaktionshastighed: den største af de reaktionshastigheder, der bestemmes med blandinger indeholdende 10 til 90 vægtprocent af det oxiderende stof.

1.3. REFERENCESTOF

Som referencestof til testen og screeningstesten benyttes bariumnitrat (analysekvalitet).

Referenceblandingen er den blanding af bariumnitrat og pulveriseret cellulose, fremstillet efter 1.6, som har den største reaktionshastighed (normalt en blanding indeholdende 60 vægtprocent bariumnitrat).

1.4. METODENS PRINCIP

Af sikkerhedshensyn udføres der en indledende screeningstest. Viser denne indledende test klart, at stoffet har oxiderende egenskaber, behøves der ikke yderligere testing. Er dette ikke tilfældet, underkastes stoffet en fuldstændig test.

Ved den fuldstændige test blandes teststoffet og et veldefineret brændbart stof i forskellige forhold. Hver blanding arrangeres i en vold, der antændes i den ene ende. Den største målte reaktionshastighed sammenlignes med referenceblandingens største reaktionshastighed.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Alle påkrævede formalings- og blandemetoder kan anvendes under den forudsætning, at den største reaktionshastighed i hver af de seks enkeltforsøg ikke afviger fra det aritmetiske gennemsnit med mere end 10 %.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelse**

1.6.1.1. *Teststof*

Prøven reduceres til en partikelstørrelse på < 0,125 mm på følgende måde: teststoffet sigtes, hvorefter den tilbageholdte fraktion formales, og denne fremgangsmåde gentages, indtil hele testmængden har passeret sigten.

Alle formalings- og sigtemetoder, der opfylder kvalitetskriterierne, kan anvendes.

Før fremstilling af blandingen tørres stoffet ved 105 °C til konstant vægt. Hvis teststoffets dekomponeringstemperatur er lavere end 105 °C, tørres stoffet ved en passende lavere temperatur.

1.6.1.2. *Brændbart stof*

Som brændbart stof anvendes der pulveriseret cellulose af den type, der bruges til tyndtlagskromatografi eller søjlekromatografi. En type, hvor 85 % af fibrene har en længde på mellem 0,020 og 0,075 mm, har vist sig egnet. Cellulosepulveret sigtes på en sigte med en maskevidde på 0,125 mm. Der bruges cellulose fra samme batch til hele testen.

Før fremstilling af blandingen tørres cellulosepulveret ved 105 °C til konstant vægt.

Hvis der benyttes savsmuld til den indledende test, fremstilles dette ved opsamling af den fraktion, der passerer gennem en sigte med maskevidden 1,6 mm, omhyggelig blanding og tørring ved 105 °C i 4 timer i et højst 25 mm tykt lag. Efter afkøling opbevares savsmuldet i en lufttæt beholder, der fyldes så meget som praktisk muligt, indtil det bruges, helst inden 24 timer efter tørringen.

1.6.1.3. *Antændelseskilde*

Som antændelseskilde anvendes der en gasflamme (diameter mindst 5 mm). Anvendes der en anden antændelseskilde (f.eks. ved test i inert atmosfære), skal dette begrundes og kilden beskrives i rapporten.

1.6.2. **Udførelse af testen**

Bemærk:

Blandinger af oxiderende stoffer med cellulose eller savsmuld skal betragtes som potentielt eksplosive og behandles med passende forsigtighed.

1.6.2.1. *Indledende test*

2 vægtdele tørret stof blandes omhyggeligt med 1 vægtdel tørret cellulose eller savsmuld, og der tildannes en lille kegleformet bunke af blandingen med en grundfladediameter på 3,5 cm og en højde på 2,5 cm, ved at fylde blandingen løst i en kegleformet form (f.eks. en laboratorietragt med tilproppet stilk).

Bunken anbringes på en kold ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade. Testen udføres i stinkskab på samme måde som testen i 1.6.2.2.

Antændelseskilden bringes i berøring med bunken. Den efterfølgende reaktions voldsomhed og varighed iagttages og registreres.

Hvis reaktionen er voldsom, skal stoffet anses for oxiderende.

Hvis resultatet på nogen måde er tvetydigt, skal den nedenfor beskrevne fuldstændige udbredelsestest udføres.

1.6.2.2. *Udbredelsestest*

Der fremstilles en række blandinger af oxiderende stof og cellulose indeholdende fra 10 til 90 vægtprocent oxiderende stof og med intervaller på 10 vægtprocent. I grænsetilfælde anvendes der blandinger derimellem, så den største reaktionshastighed bestemmes mere nøjagtigt.

Volden tildannes ved hjælp af en 250 mm lang metalform, der har trekantet tværsnit med indvendig højde 10 mm og bredde 20 mm. På hver side af formen i længderetningen er der anbragt en metalplade, der rager 2 mm op over det trekantede tværsnits overkant (se figuren). Denne indretning fyldes løst med et lille overskud af blandingen. Efter at man har ladet formen falde ned på et fast underlag fra 2 cm's højde én gang, skrabes overskuddet af med en skråtstillet plade. Sidestykkerne fjernes, og det resterende pulver glattes ud med en valse. Der lægges en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade oven på formen, det hele vendes om, og formen fjernes.

Volden anbringes i et stinkskab på tværs af luftstrømmen.

Lufthastigheden skal være tilstrækkelig til at forhindre, at røgen slipper ud i laboratoriet, og må ikke ændres under testen. Omkring apparatet opstilles der en skærm til beskyttelse mod træk.

Da cellulose og visse teststoffer er hygroskopiske, skal testen udføres så hurtigt som muligt.

Volden antændes i den ene ende ved berøring med en flamme.

Når reaktionszonen har forplantet sig 30 mm, måles dens udbredelseshastighed over de næste 200 mm.

Testen udføres med referencestoffet og mindst én gang med hver af blandingerne af teststof med cellulose.

Hvis den fundne største reaktionshastighed er væsentligt større end referenceblandingens, kan testen afbrydes; i modsat fald gentages forsøget fem gange med hver af de tre blandinger, der giver den største reaktionshastighed.

Hvis der er mistanke om, at der er fremkommet et falsk positivt resultat, gentages testen med et inert materiale med tilsvarende partikelstørrelse i stedet for cellulosen, f.eks. kiselgur. Alternativt kan den blanding af teststof og cellulose, som har den højeste reaktionshastighed, testes i inert atmosfære (< 2 % v/v oxygen).

2. DATA

Af sikkerhedshensyn anses den største reaktionshastighed — og ikke gennemsnittet — for at være den karakteristiske oxiderende egenskab ved det undersøgte stof.

Den højeste værdi af reaktionshastigheden af en serie på seks forsøg med en given blanding er relevant for vurderingen.

Hver enkelt blandings højeste reaktionshastighed afbildes mod koncentrationen af oxiderende stof. Den største reaktionshastighed aflæses på kurven.

De seks værdier af reaktionshastigheden, som er fundet med den blanding, der har den største reaktionshastighed, må ikke afvige fra det aritmetiske gennemsnit med mere end 10 %; i modsat fald må formalings- og blandemetoderne forbedres.

Den fundne største reaktionshastighed sammenlignes med referenceblandingens største reaktionshastighed (se 1.3).

Hvis der udføres tests i inert atmosfære, sammenlignes den største reaktionshastighed med referenceblandingens største reaktionshastighed bestemt i inert atmosfære.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— det undersøgte stofs identitet, sammensætning, renhedsgrad, vandindhold, m.v.

— eventuel behandling af prøven (f.eks. formaling eller tørring)

— den benyttede antændelseskilde

— måleresultaterne

— reaktionsforløbet (f.eks. forbrænding med flammer fra overfladen, gennembrænding af hele materialet og oplysninger om forbrændingsprodukter)

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne, herunder en beskrivelse af reaktionens voldsomhed (flamme, gnister, røg, ulmen, m.v.) og omtrentlige varighed i den indledende sikkerheds/screeningstest, både af test- og referencestoffet

— resultaterne af tests med et inert stof

— eventuelle resultater af tests i inert atmosfære.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Et stof skal anses for oxiderende, hvis

a) der sker voldsom reaktion under den indledende test

b) den største reaktionshastighed af de blandinger, der er undersøgt ved fuldstændig testning, er højere end eller lige så høj som referenceblandingens (dvs. cellulose og bariumnitrat) største reaktionshastighed.

For at undgå falske positive resultater skal de resultater, der opnås ved test af stoffet med et inert materiale og/eller i inert atmosfære, også tages i betragning ved fortolkningen af resultaterne.

4. LITTERATURHENVISNING

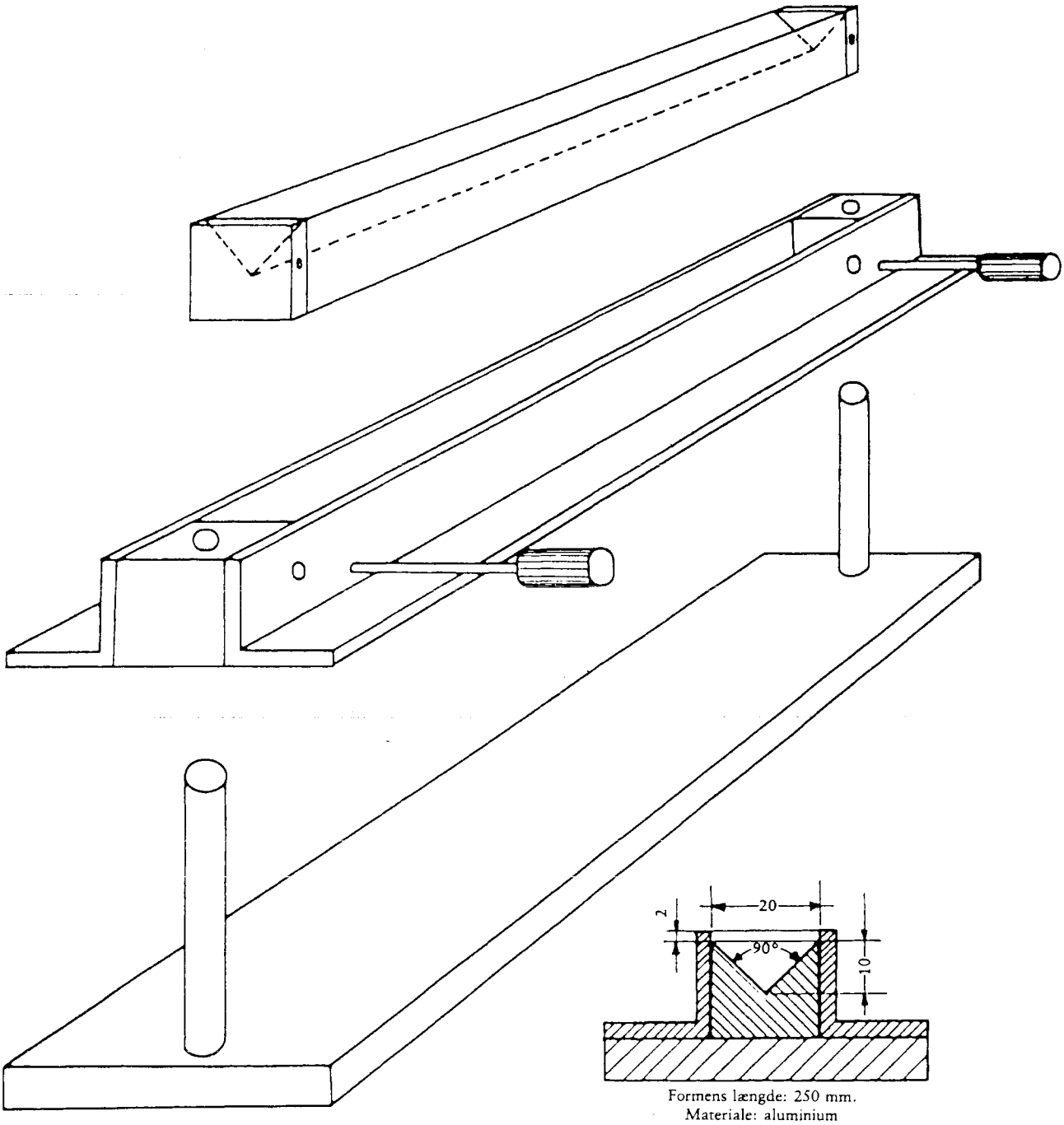
(1) NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Tillæg

Figur

Form og tilbehør til fremstilling af prøvevold

(alle dimensioner i mm)



Formens længde: 250 mm.
Materiale: aluminium

A.18. POLYMERES ANTALSMIDDELMOLEKYLVÆGT OG MOLEKYLVÆGTSFORDELING

1. METODE

Denne gelpermeationskromatografiske metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 118 (1996). Grundprincipper og yderligere tekniske oplysninger findes i reference 1.

1.1. Indledning

Da polymere kan have vidt forskellige egenskaber, er det umuligt at beskrive én metode med nøjagtig angivelse af alle betingelser for adskillelse og evaluering, som dækker alle tænkelige særtilfælde, der kan forekomme under adskillelse af polymere. Især er komplekse polymersystemer ofte uegnede til gelpermeationskromatografi (GPC). Er det ikke praktisk muligt at foretage GPC, kan molekylvægten bestemmes ved andre metoder (se bilaget). I så fald skal der gives en begrundelse for valget af metode og en fuldstændig beskrivelse af den.

Den beskrevne metode er baseret på DIN-standard 55672 (1). Heri findes der detaljerede oplysninger om, hvordan forsøgene udføres, og hvordan dataene evalueres. Hvis det bliver nødvendigt at ændre på forsøgsbetingelserne, skal disse ændringer begrundes. Der kan benyttes andre standarder, hvis der gives nøjagtige henvisninger dertil. I den beskrevne metode benyttes der polystyrenprøver med kendt polydispersitet til kalibrering; for visse polymere, f.eks. vandopløselige polymere og langkædede forgrenede polymere, kan det være nødvendigt at ændre på dette.

1.2. Definitioner og enheder

Antalsmiddelmolekylvægten M_n og vægtmiddelmolekylvægten M_w bestemmes ved følgende udtryk:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

hvor

H_i er detektorsignalets højde over basislinjen ved retentionsvolumen V_i

M_i er molekylvægten af polymerfraktionen ved retentionsvolumen V_i

n er antallet af datapunkter.

Bredden af molekylvægtsfordelingen, som er et mål for systemets dispersitet, er givet ved forholdet M_w/M_n.

1.3. Referencestoffer

Da GPC er en relativ metode, må der foretages en kalibrering. Hertil benyttes der normalt lineære polystyrenstandarder med kendte middelmolekylvægte M_n og M_w og kendt snæver molekylvægtsfordeling. Kalibreringskurven kan kun benyttes til bestemmelse af molekylvægten af den ukendte prøve, hvis der er valgt identiske betingelser for separation af prøven og standarden.

Den sammenhæng mellem molekylvægt og elueringsvolumen, der bestemmes, gælder kun for de særlige betingelser ved det bestemte forsøg. Disse betingelser er først og fremmest temperatur, opløsningsmiddel (eller opløsningsmiddelblanding), kromatograferingsbetingelser og adskillelseskolonne eller -kolonnesystem.

Den molekylvægt, der på denne måde bestemmes for prøven, er relativ og betegnes »polystyrenækvivalent molekylvægt«. Det betyder, at molekylvægten kan afvige mere eller mindre fra den absolutte værdi, afhængigt af strukturmæssige og kemiske forskelle mellem standard og prøve. Hvis der benyttes en anden standard, f.eks. polyethylenglycol, polyethylenoxid, polymethylmethacrylat eller polyacrylsyre, skal dette begrundes.

1.4. Testmetodens princip

Både molekylvægtfordelingen og middelmolekylvægten af prøven (både M_w og M_n) kan bestemmes ved GPC. GPC er en særlig type væskekromatografi, hvor prøvens bestanddele adskilles efter hydrodynamisk volumen (2).

Adskillelsen sker mens prøven passerer gennem en kolonne med porøst materiale, typisk en organisk gel. Små molekyler kan trænge ind i porerne, mens store molekyler ikke kan. På denne måde får de store molekyler en kortere vejlængde, så de elueres først. Mellemstore molekyler trænger ind i nogle af porerne og elueres senere. De mindste molekyler, hvis hydrodynamiske radius er mindre end gelens porer, kan trænge ind i alle porer og elueres sidst.

I den ideelle situation er kun molekylernes størrelse bestemmende for adskillelsen, men i praksis er det umuligt helt at undgå interferens fra absorption. Uensartet kolonnepakning og dødvolumener kan forværre dette forhold (2).

Detektoren arbejder med f.eks. brydningsindeks eller UV-absorption og giver en simpel fordelingskurve. For at få hæftet faktiske molekylvægtsværdier på kurven, må kolonnen kalibreres ved at lede polymere med kendt molekylvægt og helst stort set samme struktur, f.eks. forskellige polystyrenstandarder, gennem den. Resultatet er typisk en gauss-kurve, undertiden trukket ud i en lille hale i den lavmolekylære ende, hvor den lodrette akse viser mængden (i vægt) af de forskellige eluerede molekyler, og den vandrette akse viser logaritmen til molekylvægten.

1.5. Kvalitetskriterier

Repeterbarheden (den relative standardafvigelse) bør være mindre end 0,3 % for det eluerede volumen. Den krævede repeterbarhed for analysen skal sikres ved korrektion med intern standard, hvis et kromatogram evalueres tidsafhængigt og ikke opfylder ovennævnte kriterium (1). Polydispersiteten afhænger af standardernes molekylvægt. For polystyrenstandarder er følgende værdier typiske:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p er standardens molekylvægt ved toppens maksimum)

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Fremstilling af standardopløsninger af polystyren*

Polystyrenstandarderne opløses ved omhyggelig blanding med det valgte elueringsmiddel. Ved fremstillingen skal der nøje tages hensyn til producentens anvisninger.

Hvilken koncentration der vælges, afhænger af forskellige faktorer, f.eks. injektionsvolumen, opløsningens viskositet og detektorens følsomhed. Det maksimale injektionsvolumen skal tilpasses til kolonnens længde, så man undgår overbelastning. Typisk er injektionsvolumen for en GPC-kolonne på 30 cm × 7,8 mm normalt mellem 40 og 100 µl til analytisk separation. Større rumfang kan tillades, men det bør ikke overstige 250 µl. Det optimale forhold mellem injektionsvolumen og koncentration må fastlægges inden den egentlige kalibrering af kolonnen.

1.6.2. *Fremstilling af testopløsning*

I princippet gælder der samme krav ved fremstilling af testopløsningen. Prøven opløses i et egnet opløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran (THF), ved omhyggelig omrystning. Der må under ingen omstændigheder benyttes ultralydbad til opløsningen. Om nødvendigt kan testopløsningen renses på membranfilter med en porestørrelse mellem 0,2 og 2µm.

I den endelige rapport skal det oplyses, om der er uopløste partikler til stede, idet det kan skyldes højmolekylære bestanddele. Der benyttes en egnet metode til at bestemme den procentvise vægtmængde af de uopløste partikler. Opløsningerne benyttes inden for et døgn.

1.6.3. *Apparatur*

— opløsningsmiddelbeholder

— afgasningsapparat (hvis påkrævet)

— pumpe

— pulsdæmper (hvis påkrævet)

— injektionssystem

— kromatografikolonner

— detektor

— flowmeter (hvis påkrævet)

— skriver/databehandlingsenhed

— affaldsbeholder.

Det skal sikres, at GPC-systemet er ufølsomt over for de anvendte opløsningsmidler (f.eks. ved brug af kapillarrør af stål til THF).

1.6.4. *Injektions- og opløsningsmiddeltilførselssystem*

Der sættes et veldefineret volumen af prøveopløsningen på kolonnen, enten med en autosampler eller manuelt i en skarpt afgrænset zone. For hurtig tilbagetrækning eller indtrykning af stemplet i injektionssprøjten ved manuel indsprøjtning kan medføre ændringer i den iagttagne molekylvægtsfordeling. Systemet for tilførsel af opløsningsmiddel skal så vidt muligt være pulsationsfrit, helst indeholde en pulsdæmper. Flowet skal være omkring 1 ml/min.

1.6.5. *Kolonne*

Afhængigt af prøven karakteriseres polymeren enten på en enkelt kolonne eller på flere serieforbundne kolonner. I handelen fås en række porøse kolonnematerialer med veldefinerede egenskaber (f.eks. porestørrelse og øvre og nedre grænse). Valget af separationsgel og kolonnelængde afhænger af prøvens egenskaber (hydrodynamisk volumen og molekylvægtsfordeling) og af de specifikke adskillelsesbetingelser såsom opløsningsmiddel, temperatur og flowhastighed (1) (2) (3).

1.6.6. *Teoretiske bunde*

Den kolonne eller kolonnekombination, der benyttes til adskillelse, skal karakteriseres ved antallet af teoretiske bunde. Ved brug af THF som opløsningsmiddel gøres dette ved, at man sætter en opløsning af ethylbenzen eller et andet passende ikke-polært opløst stof på en kolonne af kendt længde. Antallet af teoretiske bunde er givet ved følgende udtryk:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{eller} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

hvor,

N er antallet af teoretiske bunde

V_e er elueringsvolumenet ved toppens maksimum

W er toppens bredde ved basislinjen

$W_{1/2}$ er toppens bredde i halv højde.

1.6.7. *Adskillelseseffektiviteten*

Ud over antallet af teoretiske bunde, som er en størrelse, der bestemmer båndbredden, spiller også adskillelseseffektiviteten en rolle, og den bestemmes ved kalibreringskurvens stejlhed. En kolonnes adskillelseseffektivitet er givet ved følgende sammenhæng:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{Kolonnens tværsnit}} \geq 6{,}0 \quad \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

hvor

V_{e,M_x} er elueringsvolumenet for polystyren med molekylvægten M_x

$V_{e,(10M_x)}$ er elueringsvolumenet for polystyren med en ti gange så høj molekylvægt.

Systemets adskillelsesevne defineres normalt som følger:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

hvor

V_{e1} og V_{e2} er elueringsvolumen for de to polystyrenstandarder ved toppenes maksimum

W_1 og W_2 er toppenes bredde ved basislinjen

M_1 og M_2 er molekylvægtene ved toppenes højde (normalt en forskel på en faktor 10).

R-værdien for kolonnesystemet bør være større end 1,7 (4).

1.6.8. *Opløsningsmidler*

Alle opløsningsmidler skal være af høj renhed (for THF en renhedsgrad på 99,5 %). Opløsningsmiddelbeholderen (om nødvendigt med inert atmosfære) skal rumme tilstrækkelig meget til, at kolonnen kan kalibreres, og der kan analyseres flere prøver. Opløsningsmidlet skal afgasses, inden det pumpes videre til kolonnen.

1.6.9. *Temperaturregulering*

Temperaturen i de kritiske komponenter (injektionssløjfe, kolonner, detektor og rør og slanger) skal være konstant og passe til det valgte opløsningsmiddel.

1.6.10. *Detektor*

Detektoren har til formål at give et kvantitativt mål for koncentrationen af teststoffet i eluatet fra kolonnen. For at gøre den uundgåelige forbredning af toppene mindst mulig skal detektorcellens volumen være så lille som muligt. Det må ikke være større end 10 µl, undtagen for detektorer baseret på lysspredning og viskositet. Sædvanligvis benyttes der differentialrefraktometri til detektering. Hvis særlige egenskaber ved prøve eller elueringsmiddel kræver det, kan der benyttes andre detektortyper, f.eks. UV/VIS-, IR- eller viskositetsdetektor.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. Data

Der henvises til DIN-standarden (1) for så vidt angår detaljerede evalueringskriterier og krav til dataindsamling og -behandling.

Der udføres to uafhængige forsøg med hver prøve. De analyseres hver for sig.

M_n, M_w, M_w/M_n og M_z anføres for hver måling. Det skal udtrykkelig anføres, at de målte værdier er relative værdier svarende til den benyttede standards molekylvægt.

Efter at retentionsvolumen eller retentionstid (eventuelt korrigeret ved hjælp af intern standard) er bestemt, afbildes værdier af log M_p (M_p er maksimum for kalibreringsstandardens top) mod en af disse størrelser. Der kræves mindst to kalibreringspunkter i hver molekylvægtsdekade og mindst fem målepunkter for hele kurven; sidstnævnte bør spænde over prøvens formodede molekylvægt. Slutpunktet i kalibreringskurvens lavmolekylære ende fastlægges ved n-hexylbenzen eller et andet passende ikke-polært stof. Antals- og vægtmiddelmolekylvægten bestemmes i reglen ved elektronisk databehandling på grundlag af udtrykkene i punkt 1.2. Til brug for manuel behandling er der yderligere oplysninger i ASTM D 3536/91 (3).

Fordelingskurven skal forelægges i form af en tabel eller en figur (frekvens eller kumulativ sum mod log M). I en grafisk fremstilling skal en molekylær dekade normalt svare til ca. 4 cm i bredden, og den maksimale tophøjde skal være ca. 8 cm høj. I tilfælde af en integreret fordeling skal forskellen mellem 0 og 100 % på ordinaten være ca. 10 cm.

2.2. Testrapport

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.2.1. *Teststof*

— foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder)

— beskrivelse af behandling af prøven, iagttagelser, problemer.

2.2.2. *Instrumenter*

— beholder til elueringsmiddel, inert gas, afgasning af elueringsmiddel, elueringsmidlets sammensætning, urenheder

— pumpe, pulsdæmper, injektionssystem

— separationskolonner (fabrikat, alle specifikationer for kolonnen, såsom porestørrelse og separationsmaterialets art, samt antal, længde og rækkefølge af de anvendte kolonner)

— antal teoretiske bunde i kolonnen (eller kolonnekombinationen), adskillelseseffektivitet (systemets adskillelsesevne)

— oplysninger om toppenes symmetri

— kolonnetemperatur, temperaturregulering

— detektor (måleprincip, type, cellevolumen)

— eventuelt flowmeter (fabrikat, måleprincip)

— dataopsamlings- og databehandlingssystem (hardware og software).

2.2.3. *Kalibrering af systemet*

— detaljeret beskrivelse af den metode, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven

— oplysninger om kvalitetskriterier for metoden (f.eks. korrelationskoefficient, sum af afvigelsers kvadrater)

— oplysninger om alle ekstrapoleringer, forudsætninger og tilnærmelser, der er gjort under forsøget og dataevalueringen og -behandlingen.

— alle målinger, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven, skal dokumenteres i en tabel, som indeholder følgende oplysninger om hvert enkelt kalibreringspunkt:

  — prøvens navn

  — fabrikant

  — karakteristiske værdier af parametrene M_p, M_n, M_w og M_w/M_n, som oplyst af fabrikanten eller udledt ved efterfølgende målinger samt detaljerede oplysninger om målemetoden

  — inejktionsvolumen og -koncentration

  — benyttet M_p-værdi ved kalibrering

— elueringsvolumen eller korrigeret retentionstid målt ved topmaksimum

— M_p-værdi beregnet ved topmaksimum

— procentvis fejl på den beregnede M_p-værdi og kalibreringsværdien.

2.2.4. *Evaluering*

— evaluering på tidsbasis: angivelse af, hvilke metoder der benyttes til at sikre den krævede reproducerbarhed (korrektionsmetode, intern standard, mv.)

— oplysninger om, om evalueringen er foretaget på grundlag af elueringsvolumen eller retentionstid

— oplysninger om begrænsningerne for evalueringen, hvis en top ikke er fuldstændigt analyseret

— beskrivelse af eventuelle udglatningsmetoder

— procedurer for tilberedning og forbehandling af prøven

— tilstedeværelse af eventuelle uopløste partikler

— injektionsvolumen (µl) og injektionskoncentration (mg/ml).

— iagttagelser, der tyder på afvigelser fra den ideelle GPC-profil

— detaljeret beskrivelse af alle ændringer i testproceduren

— detaljerede oplysninger om usikkerhedsintervaller

— alle øvrige oplysninger og iagttagelser, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3. REFERENCER

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Bilag

Eksempler på andre metoder til bestemmelse af antalsmiddelmolekylvægt (M_n) for polymere

Gelpermeationskromatografi er den foretrukne metode til bestemmelse af M_n, især når der er rådighed over et sæt standarder med tilnærmelsesvis samme struktur som den pågældende polymer. Hvis der er praktiske problemer med at udføre GPC, eller hvis der allerede er en formodning om, at stoffet ikke kan opfylde det fastsatte M_n-kriterium (og dette ønskes bekræftet), er der alternative metoder til rådighed, f.eks.:

1. Brug af kolligative egenskaber

1.1. *Ebullioskopi/kryoskopi* består i at måle et opløsningsmiddels kogepunktsforhøjelse (ebullioskopi) eller frysepunktssænkning (kryoskopi), når polymeren tilsættes. Metoden bygger på, at den opløste polymers indvirkning på væskens kogepunkt/frysepunkt afhænger af dens molekylvægt (1) (2).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$.

1.2. *Damptrykssænkning* består i at måle damptrykket af en valgt referencevæske før og efter tilsætning af en kendt mængde polymer (1) (2).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$ (teoretisk; i praksis dog af begrænset værdi).

1.3 *Membranosmometri* bygger på det osmotiske princip, dvs. opløsningsmiddelmolekylers naturlige tendens til at passere gennem en semipermeabel membran fra en tynd til en mere koncentreret opløsning for at etablere ligevægt. Ved testen har den tynde opløsning en koncentration på nul, mens den mere koncentrerede opløsning indeholder polymeren. Opløsningsmidlets bevægelse gennem membranen giver en trykforskel, der afhænger af polymerens koncentration og molekylvægt (1) (3) (4).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000 - 200\,000$.

1.4 *Gasfaseosmometri* består i at sammenligne fordampningshastigheden i en ren opløsningsmiddelaerosol med mindst tre aerosoler, der indeholder den pågældende polymer i forskellige koncentrationer (1) (5) (6).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$.

2. Endegruppeanalyse

For at kunne bruge denne metode skal man have kendskab både til polymerens overordnede struktur og til kædetermineringsgruppernes karakter (endegrupperne skal kunne skelnes fra hovedskelettet ved f.eks. NMR eller titrering/derivatisering). Ved bestemmelse af den molekylære koncentration af endegrupper i polymeren kan man nå frem til en værdi for molekylvægten (7) (8) (9).

Anvendelsesområde: M_n op til 50 000 (idet pålideligheden aftager).

REFERENCER

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Muller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

A.19 POLYMERES INDHOLD AF LAVMOLEKYLÆRE BESTANDDELE

1. METODE

Denne gelpermeationskromatografiske metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 119 (1996). Grundprincipper og yderligere tekniske oplysninger findes i reference 1.

1.1. Indledning

Da polymere kan have vidt forskellige egenskaber, er det umuligt at beskrive én metode med nøjagtig angivelse af alle betingelser for adskillelse og evaluering, som dækker alle tænkelige særtilfælde, der kan forekomme under adskillelse af polymere. Især er komplekse polymersystemer ofte uegnede til gelpermeationskromatografi (GPC). Er det ikke praktisk muligt at foretage GPC, kan molekylvægten bestemmes ved andre metoder (se bilaget). I så fald skal der gives en begrundelse for valget af metode og en fuldstændig beskrivelse af den.

Den beskrevne metode er baseret på DIN-standard 55672 (1). Heri findes der detaljerede oplysninger om, hvordan forsøgene udføres, og hvordan dataene evalueres. Hvis det bliver nødvendigt at ændre på forsøgsbetingelserne, skal disse ændringer begrundes. Der kan benyttes andre standarder, hvis der gives nøjagtige henvisninger dertil. I den beskrevne metode benyttes der polystrenprøver med kendt polydispersitet til kalibrering; for visse polymere, f.eks. vandopløselige polymere og langkædede forgrenede polymere, kan det være nødvendigt at ændre på dette.

1.2. Definitioner og enheder

Lavmolekylære bestanddele defineres arbitrært som bestanddele med en molekylvægt på mindre end 1 000 dalton.

Antalsmiddelmolekylvægten M_n og vægtmiddelmolekylvægten M_w bestemmes ved følgende udtryk:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

hvor

H_i er detektorsignalets højde over basislinjen ved retentionsvolumen V_i;

M_i er molekylvægten af polymerfraktionen ved retentionsvolumen V_i;

n er antallet af datapunkter.

Bredden af molekylvægtsfordelingen, som er et mål for systemets dispersitet, er givet ved forholdet M_w/M_n.

1.3. Referencestoffer

Da GPC er en relativ metode, må der foretages en kalibrering. Hertil benyttes der normalt lineære polystyrenstandarder med kendte middelmolekylvægte M_n en M_w og kendt snæver molekylvægtsfordeling. Kalibreringskurven kan kun benyttes til bestemmelse af molekylvægten af den ukendte prøve, hvis der er valgt identiske betingelser for separation af prøven og standarden.

Den sammenhæng mellem molekylvægt og elueringsvolumen, der bestemmes, gælder kun for de særlige betingelser ved det bestemte forsøg. Disse betingelser er først og fremmest temperatur, opløsningsmiddel (eller opløsningsmiddelblanding), kromatograferingsbetingelser og adskillelseskolonne eller -kolonnesystem.

Den molekylvægt, der på denne måde bestemmes for prøven, er relativ og betegnes »polystyrenækvivalent molekylvægt«. Det betyder, at molekylvægten kan afvige mere eller mindre fra den absolutte værdi, afhængigt af strukturmæssige og kemiske forskelle mellem standard og prøve. Hvis der benyttes en anden standard, f.eks. polyethylenglycol, polyethylenoxid, polymethylmethacrylat eller polyacrylsyre, skal dette begrundes.

1.4. Testmetodens princip

Både molekylvægtfordelingen og middelmolekylvægten af prøven (både M_w og M_n) kan bestemmes ved GPC. GPC er en særlig type væskekromatografi, hvor prøvens bestanddele adskilles efter hydrodynamisk volumen (2).

Adskillelsen sker mens prøven passerer gennem en kolonne med porøst materiale, typisk en organisk gel. Små molekyler kan trænge ind i porene, mens store molekyler ikke kan. På denne måde får de store molekyler en kortere vejlængde, så de elueres først. Mellemstore molekyler trænger ind i nogle af porerne og elueres senere. De mindste molekyler, hvis hydrodynamiske radius er mindre end gelens porer, kan trænge ind i alle porer og elueres sidst.

I den ideelle situation er kun molekylernes størrelse bestemmende for adskillelsen, men i praksis er det umuligt helt at undgå interferens fra absorption. Uensartet kolonnepakning og dødvolumener kan forværre dette forhold (2).

Detektoren arbejder med f.eks. brydningsindeks eller UV-absorption og giver en simpel fordelingskurve. For at få hæftet faktiske molekylvægtsværdier på kurven, må kolonnen kalibreres ved at lede polymere med kendt molekylvægt og helst stort set samme struktur, f.eks. forskellige polystyrenstandarder, gennem den. Resultatet er typisk en gauss-kurve, undertiden trukket ud i en lille hale i den lavmolekylære ende, hvor den lodrette akse viser mængden (i vægt) af de forskellige eluerede molekyler, og den vandrette akse viser logaritmen til molekylvægten.

Af denne kurve udledes indholdet af lavmolekylære bestanddele. Beregningen er kun nøjagtig, hvis de lavmolekylære bestanddele modsvarer polymeren som helhed på massebasis.

1.5. Kvalitetskriterier

Repeterbarheden (den relative standardafvigelse) bør være mindre end 0,3 % for det eluerede volumen. Den krævede repeterbarhed for analysen skal sikres ved korrektion med intern standard, hvis et kromatogram evalueres tidsafhængigt og ikke opfylder ovennævnte kriterium (1). Polydispersiteten afhænger af standardernes molekylvægt. For polystyrenstandarder er følgende værdier typiske:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p er standardens molekylvægt ved toppens maksimum)

1.6. Beskrivelse af testmetoden

1.6.1. *Fremstilling af standardopløsninger af polystyren*

Polystyrenstandarderne opløses ved omhyggelig blanding med det valgte elueringsmiddel. Ved fremstillingen skal der nøje tages hensyn til producentens anvisninger.

Hvilken koncentration der vælges, afhænger af forskellige faktorer, f.eks. injektionsvolumen, opløsningens viskositet og detektorens følsomhed. Det maksimale injektionsvolumen skal tilpasses til kolonnens længde, så man undgår overbelastning. Typisk er injektionsvolumen for en GPC-kolonne på 30 cm × 7,8 mm normalt mellem 40 og 100 µl til analytisk separation. Større rumfang kan tillades, men det bør ikke overstige 250 µl. Det optimale forhold mellem injektionsvolumen og koncentration må fastlægges inden den egentlige kalibrering af kolonnen.

1.6.2. *Fremstilling af testopløsning*

I princippet gælder der samme krav ved fremstilling af testopløsningen. Prøven opløses i et egnet opløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran (THF) ved omhyggelig omrystning. Der må under ingen omstændigheder benyttes ultralydbad til opløsningen. Om nødvendigt kan testopløsningen renses på membranfilter med en porestørrelse mellem 0,2 og 2 µm.

I den endelige rapport skal det oplyses, om der er uopløste partikler til stede, idet det kan skyldes højmolekylære bestanddele. Der benyttes en egnet metode til at bestemme den procentvise vægtmængde af de uopløste partikler. Opløsningerne benyttes inden for et døgn.

1.6.3. *Korrektion for indhold af urenheder og additiver*

Det er normalt nødvendigt at korrigere indholdet af bestanddele med $M < 1\,000$ for bidrag fra ikke-polymere bestanddele (f.eks. urenheder og/eller additiver), medmindre der allerede er målt et indhold på < 1 %. Dette gøres ved direkte analyse på polymeropløsningen eller GPC-eluatet.

hvis eluatet efter passage af kolonnen er for fortyndet til yderligere analyse, må det koncentreres. Det kan være nødvendigt at inddampe eluatet til tørhed og genopløse det. Eluatet skal koncentreres på en sådan måde, at der med sikkerhed ikke sker ændringer i det. Behandlingen af eluatet efter GPC-trinnet vil afhænge af, hvilken analysemetode der anvendes til kvantitativ bestemmelse.

1.6.4. *Apparatur*

GPC-udstyr bestående af følgende komponenter:

— opløsningsmiddelbeholder

— afgasningsapparat (hvis påkrævet)

— pumpe

— pulsdæmper (hvis påkrævet)

— injektionssystem

— kromatografikolonner

— detektor

— flowmeter (hvis påkrævet)

— skriver/databehandlingsenhed

— affaldsbeholder.

Det skal sikres, at GPC-systemet er ufølsomt over for de anvendte opløsningsmidler (f.eks. ved brug af kapillarrør af stål til THF).

1.6.5. *Injektions- og opløsningsmiddeltilførselssystem*

Der sættes et veldefineret volumen af prøveopløsningen på kolonnen, enten med en autosampler eller manuelt i en skarpt afgrænset zone. For hurtig tilbagetrækning eller indtrykning af stemplet i injektionssprøjten ved manuel indsprøjtning kan medføre ændringer i den iagttagne molekylvægtsfordeling. Systemet for tilførsel af opløsningsmiddel skal så vidt muligt være pulsationsfrit, helst indeholde en pulsdæmper. Flowet skal være omkring 1 ml/min.

1.6.6. *Kolonne*

Afhængigt af prøven karakteriseres polymeren enten på en enkelt kolonne eller på flere serieforbundne kolonner. I handelen fås en række porøse kolonnematerialer med veldefinerede egenskaber (f.eks. porestørrelse og øvre og nedre grænse). Valget af separationsgel og kolonnelængde afhænger af prøvens egenskaber (hydrodynamisk volumen og molekylvægtsfordeling) og af de specifikke adskillelsesbetingelser såsom opløsningsmiddel, temperatur og flowhastighed (1) (2) (3).

1.6.7. *Teoretiske bunde*

Den kolonne eller kolonnekombination, der benyttes til adskillelsen, skal karakteriseres ved antallet af teoretiske bunde. Ved brug af THF som opløsningsmiddel gøres dette ved, at man sætter en opløsning af ethylbenzen eller et anden passende ikke-polært opløst stof på en kolonne af kendt længde. Antallet af teoretiske bunde er givet ved følgende udtryk:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{eller} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

hvor

N er antallet af teoretiske bunde

V_e er elueringsvolumenet ved toppens maksimum

W er toppens bredde ved basislinjen

$W_{1/2}$ er toppens bredde i halv højde.

1.6.8. *Adskillelseseffektiviteten*

Ud over antallet af teoretiske bunde, som er en størrelse, der bestemmer båndbredden, spiller også adskillelseseffektiviteten en rolle, og den bestemmes ved kalibreringskurvens stejlhed. En kolonnes adskillelseseffektivitet er givet ved følgende sammenhæng:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{Kolonnens tværsnit}} \geq 6{,}0 \quad \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

hvor

V_{e,M_x} er elueringsvolumenet for polystyren med molekylvægten M_x

$V_{e,(10M_x)}$ er elueringsvolumenet for polystyren med en ti gange så høj molekylvægt.

Systemets adskillelsesevne defineres normalt som følger:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

hvor

V_{e1} og V_{e2} er elueringsvolumen for de to polystyrenstandarder ved toppenes maksimum

W_1 og W_2 er toppenes bredde ved basislinjen

M_1 og M_2 er molekylvægtene ved toppenes højde (normalt en forskel på en faktor 10).

R-værdien for kolonnesystemet bør være større end 1,7 (4).

1.6.9. *Opløsningsmidler*

Alle opløsningsmidler skal være af høj renhed (for THF en renhedsgrad på 99,5 %). Opløsningsmiddelbeholderen (om nødvendigt med inert atmosfære) skal rumme tilstrækkelig meget til, at kolonnen kan kalibreres, og der kan analyseres flere prøver. Opløsningsmidlet skal afgasses, inden det pumpes videre til kolonnen.

1.6.10. *Temperaturregulering*

Temperaturen i de kritiske komponenter (injektionssløjfe, kolonner, detektor og rør og slanger) skal være konstant og passe til det valgte opløsningsmiddel.

1.6.11. *Detektor*

Detektoren har til formål at give et kvantitativt mål for koncentrationen af teststoffet i eluatet fra kolonnen. For at gøre den uundgåelige forbredning af toppene mindst mulig skal detektorcellens volumen være så lille som muligt. Det må ikke være større end 10 µl, undtagen for detektorer baseret på lysspredning og viskositet. Sædvanligvis benyttes der differentialrefraktometri til detektering. Hvis særlige egenskaber ved prøve eller elueringsmiddel kræver det, kan der benyttes andre detektortyper, f.eks. UV/VIS-, IR-eller viskositetsdetektor.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. Data

Der henvises til DIN-standarden (1) for så vidt angår detaljerede evalueringskriterier og krav til dataindsamling og -behandling.

Der udføres to uafhængige forsøg med hver prøve. De analyseres hver for sig. Det er i alle tilfælde vigtigt også at bestemme data for blindprøver, der er behandlet på samme måde som prøven.

Det skal udtrykkelig anføres, at de målte værdier er relative værdier svarende til den benyttede standards molekylvægt.

Efter at retentionsvolumen eller retentionstid (eventuelt korrigeret ved hjælp af intern standard) er bestemt, afbildes værdier af log M_p (M_p er maksimum for kalibreringsstandardens top) mod en af disse størrelser. Der kræves mindst to kalibreringspunkter i hver molekylvægtsdekade og mindst fem målepunkter for hele kurven; sidstnævnte bør spænde over prøvens formodede molekylvægt. Slutpunktet i kalibreringskurvens lavmolekylære ende fastlægges ved n-hexylbenzen eller et andet passende ikke-polært stof. Den del af kurven, der svarer til molekylvægte under 1 000, bestemmes og korrigeres efter behov for urenheder og additiver. Elueringskurverne evalueres i reglen ved elektronisk databehandling. Til brug for manuel behandling er der yderligere oplysninger i ASTM D 3536-91 (3).

Uopløselig polymer, der måtte være tilbageholdt på kolonnen, vil efter al sandsynlighed have en molekylvægt, der er større end den opløselige fraktions, så hvis den lades ude af betragtning, vil indholdet af lavmolekylære bestanddele blive anslået for højt. I bilaget er der en vejledning i, hvordan indholdet af lavmolekylære bestanddele korrigeres for uopløselig polymer.

Fordelingskurven skal forelægges i form af en tabel eller en figur (frekvens eller kumulativ sum mod log M). I en grafisk fremstilling skal en molekylær dekade normalt svare til ca. 4 cm i bredden, og den maksimale tophøjde skal være ca. 8 cm høj. I tilfælde af en integreret fordeling skal forskellen mellem 0 og 100 % på ordinaten være ca. 10 cm.

2.2. Testrapport

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.2.1. *Teststof*

— Foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder)

— Beskrivelse af behandling af prøven, iagttagelser, problemer.

2.2.2. *Instrumenter*

— Beholder til elueringsmiddel, inert gas, afgasning af elueringsmiddel, elueringsmidlets sammensætning, urenheder

— Pumpe, pulsdæmper, injektionssystem

— Separationskolonner (fabrikat, alle specifikationer for kolonnen, såsom porestørrelse og separationsmaterialets art, samt antal, længde og rækkefølge af de anvendte kolonner)

— Antal teoretiske bunde i kolonnen (eller kolonnekombinationen), adskillelseseffektivitet (systemets adskillelsesevne)

— Oplysninger om toppenes symmetri

— Kolonnetemperatur, temperaturregulering

— Detektor (måleprincip, type, cellevolumen)

— Eventuelt flowmeter (fabrikat, måleprincip)

— Dataopsamlings- og databehandlingssystem (hardware og software).

2.2.3. *Kalibrering af systemet*

— Detaljeret beskrivelse af den metode, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven

— Oplysninger om kvalitetskriterier for metoden (f.eks. korrelationskoefficient, sum af afvigelsers kvadrater)

— Oplysninger om alle ekstrapoleringer, forudsætninger og tilnærmelser, der er gjort under forsøget og dataevalueringen og -behandlingen

— Alle målinger, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven, skal dokumenteres i en tabel, som indeholder følgende oplysninger om hvert enkelt kalibreringspunkt:

  — prøvens navn

  — fabrikant

  — karakteristiske værdier af parametrene M_p, M_n, M_w og M_w/M_n, som oplyst af fabrikanten udledt ved efterfølgende målinger samt detaljerede oplysninger om målemetoden

  — injektionsvolumen og -koncentration

  — benyttet M_p-værdi ved kalibrering

  — elueringsvolumen eller korrigeret retentionstid målt ved topmaksimum

  — M_p-værdi beregnet ved topmaksimum.

  — procentvis fejl på den beregnede M_p-værdi og kalibreringsværdien.

2.2.4. *Oplysninger om indholdet af lavmolekylære bestanddele*

— beskrivelse af de metoder, der er benyttet til analysen, og hvordan forsøgene er udført

— oplysninger om det procentvise indhold (w/w) af lavmolekylære bestanddele i forhold til hele prøven

— oplysninger om urenheder, additiver og andre ikke-polymere bestanddele i vægtprocent i forhold til hele prøven

2.2.5. *Evaluering*

— Evaluering på tidsbasis: angivelse af, hvilke metoder der benyttes til at sikre den krævede reproducerbarhed (korrektionsmetode, intern standard, mv.)

— Oplysninger om, om evalueringen er foretaget på grundlag af elueringsvolumen eller retentionstid

— Oplysninger om begrænsningerne for evalueringen, hvis en top ikke er fuldstændigt analyseret

— Beskrivelse af eventuelle udglatningsmetoder

— Procedurer for tilberedning og forbehandling af prøven

— Tilstedeværelse af eventuelle uopløste partikler

— Injektionsvolumen (µl) og injektionskoncentration (mg/ml)

— Iagttagelser, der tyder på afvigelser fra den ideelle GPC-profil

— Detaljeret beskrivelse af alle ændringer i testproceduren

— Detaljerede oplysninger om usikkerhedsintervaller

— Alle øvrige oplysninger og iagttagelser, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3. REFERENCER

(1) DIN 55672 (1995) Geldpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Bilag

Vejledning I, hvordan indholdet af lavmolekylære bestanddele korrigeres for uopløselig polymer

Indhold af uopløselig polymer i prøven vil medføre et vist massetab under GPC-analysen. Den uopløselige polymer tilbageholdes irreversibelt på kolonnen eller prøvefiltret, mens den opløselige del af prøven passerer gennem kolonnen. Hvis tilvæksten i polymerens brydningsindeks (dn/dc) kan skønnes eller måles, kan man få et skøn over, hvor stor en masse der er gået tabt på kolonnen. I så fald foretages korrektionen ved hjælp af en ekstern kalibrering med standardmaterialer med kendt koncentration og dn/dc, så refraktometerets udslag kalibreres. I nedenstående eksempel er der benyttet en standard af poly(methylmethacrylat) (pMMA).

Ved ekstern kalibrering med henblik på analyse af acrylpolymere analyseres en pMMA-standard med kendt koncentration i tetrahydrofuran ved GPC, og de fremkomme data benyttes til bestemmelse af refraktometerkonstanten efter følgende udtryk:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

hvor

K er refraktometerkonstanten (i mikrovolt-sekund/ml)

R er pMMA-standardens udslag (mikrovolt-sekund)

C er pMMA-standardens koncentration (i mg/ml)

V er injektionsvolumenet (i ml)

dn/dc er brydningsindekstilvæksten for pMMA i tetrahydrofuran (i ml/mg).

Følgende data er typiske for en pMMA-standard:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Den fremkomne K-værdi på $3{,}05 \times 10^{11}$ benyttes derefter til beregning af det teoretiske detektorudslag, hvis 100 % af polymeren elueres gennem detektoren.

A.20 POLYMERES OPLØSELIGHED/EKSTRAHERBARHED I VAND

1. METODE

Den beskrevne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 120 (1997). Yderligere tekniske oplysninger findes i reference 1.

1.1. Indledning

For visse polymere, f.eks. emulsionspolymere, kan det være nødvendigt at gøre yderligere forberedelser, inden den nedenfor beskrevne metode kan benyttes. Metoden kan ikke anvendes for flydende polymere og polymere, der kan reagere med vand under testbetingelserne.

Når metoden ikke er bekvem eller er umulig at benytte, må opløseligheden/ekstraherbarheden undersøges ved andre metoder. I så fald skal der gives en begrundelse for valget af metode og en fuldstændig beskrivelse af den.

1.2. Referencestoffer

Ingen.

1.3. Testmetodens princip

Polymeres opløselighed/ekstraherbarhed i vandigt medium bestemmes ved hjælp af kolbemetoden (jf. A.6 Vandopløselighed — kolbemetoden) med de i det følgende beskrevne ændringer.

1.4. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.5. Beskrivelse af testmetoden

1.5.1. *Udstyr*

Der er brug for følgende udstyr til metoden:

— findelingsapparat, f.eks. mølle, til fremstilling af partikler med kendt størrelse

— rysteapparat med mulighed for temperaturregulering

— membranfilter

— egnet analyseudstyr

— standardsigter.

1.5.2. *Prøveforberedelse*

En repræsentativ prøve skal først findeles til en partikelstørrelse mellem 0,125 og 0,25 mm bestemt med passende sigter. Af hensyn til prøvens stabilitet, kan køling være påkrævet under formalingen. Materialer af gummiagtig karakter kan knuses ved flydende nitrogens temperatur (1).

Hvis det ikke er muligt at nå ned på den krævede partikelstørrelse, skal der tilstræbes den mindst mulige partikelstørrelse, og det opnåede resultat anføres. Det oplyses i rapporten, hvordan den findelte prøve har været opbevaret indtil udførelse af testen.

1.5.3. *Fremgangsmåde*

Der afvejes tre prøver på hver 10 g af teststoffet i tre glaskolber med glasprop, og der tilsættes 1 000 ml vand til hver kolbe. Hvis det ikke er praktisk muligt at håndtere 10 g af polymeren, anvendes den største mængde, der kan håndteres, og vandmængden reduceres tilsvarende.

Kolberne lukkes tæt til og omrystes ved 20 °C. Der benyttes en anordning, der kan arbejde ved konstant temperatur. Efter 24 timer centrifugeres eller filtreres indholdet af hver enkelt kolbe, og polymerkoncentrationen i den klare vandfase bestemmes med en passende analysemetode. Findes der ingen passende analysemetoder for vandfasen, kan den samlede opløselighed/ekstraherbarhed skønnes ud fra den tørre vægt af filterkagen eller bundfaldet fra centrifugeringen.

Normalt er det nødvendigt at skelne kvantitativt mellem urenheder og additiver på den ene side og lavmolekylære forbindelser på den anden side. Ved gravimetrisk bestemmelse er det ligeledes vigtigt at medtage en blindprøve uden teststof, så der tages højde for restmateriale hidrørende fra forsøgets udførelse.

Polymeres opløselighed/ekstraherbarhed i vand ved 37 °C ved pH2 og pH9 kan bestemmes som beskrevet ved udførelse af eksperimentet ved 20 °C. PH indstilles ved hjælp af egnede bufferopløsninger, syrer eller baser, f.eks. saltsyre, eddikesyre, natrium- eller kaliumhydroxid af analysekvalitet eller ammoniak.

Der udføres en eller to prøver, afhængigt af den benyttede analysemetode. Når der findes tilstrækkelig specifikke metoder til direkte analyse af vandfasen for polymerkomponenten, skulle én prøve som ovenfor beskrevet være tilstrækkeligt. Hvis der derimod ikke findes sådanne metoder og polymerens opløselighed/ekstraherbarhed må bestemmes indirekte ved analyse af det vandige ekstrakts indhold af organisk kulstof i alt (TOC), bør der udføres endnu en prøve. Prøven bør gentages endnu en gang, denne gang med en ti gange mindre polymermængde, men samme vandmængde som ved den første prøve.

1.5.4. *Analyse*

1.5.4.1. Test udført med kun én prøvestørrelse

I nogle tilfælde findes der metoder til direkte analyse af polymerkomponenter i vandfasen. Alternativt kan man overveje indirekte at analysere for opløste/ekstraherede polymerkomponenter ved at bestemme den samlede mængde opløste bestanddele og korrigere for ikke-polymerspecifikke komponenter.

Analyse af vandfasen for samtlige polymerforbindelser kan foretages ved

enten en tilstrækkelig følsom metode, f.eks.

— TOC-bestemmelse ved nedbrydning til CO_2 med persulfat eller dichromat efterfulgt af måling ved IR eller kemisk analyse

— atomabsorptionsspektrometri (AAS) eller induktivt koblet plasmaemissionsspektrometri (ICP) for silicium- eller metalholdige polymere

— UV-absorption er spektrofluorimetri for arylpolymere

— LC-MS for lavmolekylære prøver

eller ved vakuuminddampning af det vandige ekstrakt til tørhed og analyse af remanensen ved spektroskopi (IR. UV mv.) eller AAS/ICP.

Hvis det ikke er praktisk muligt at gennemføre en analyse af selve vandfasen, ekstraheres vandekstraktet med et organisk opløsningsmiddel, der ikke er blandbart med vand, f.eks. en chloreret kulbrinte. Derefter afdampes opløsningsmidlet, og remanensen analyseres som ovenfor for indhold af den pågældende polymer. Bestanddele i denne remanens, som identificeres som urenheder eller additiver, fratrækkes, når selve polymerens opløselighed/ekstraherbarhed beregnes.

Når der er forholdsvis store stofmængder til stede, kan det være nødvendigt at foretage f.eks. HPLC- eller GC-analyse af remanensen for at skelne urenheder fra monomere og monomerderivater, så det virkelige indhold af sidstnævnte kan bestemmes.

I nogle tilfælde vil simpel afdampning af det organiske opløsningsmiddel og vejning af den tørre remanens være tilstrækkeligt.

1.5.4.2. Test udført med to forskellige prøvestørrelser

Alle vandige ekstrakter analyseres for TOC.

Der foretages gravimetrisk bestemmelse af den del af prøven, der ikke er gået i opløsning. Hvis der efter centrifugering eller filtrering af de enkelte kolbers indhold stadig sidder polymerrester fast på kolbens væg, skylles kolben med filtratet, indtil der ikke længere er synlige rester i kolben. Derefter centrifugeres eller filtreres filtratet igen. Filterkagen eller bundfaldet fra centrifugeringen tørres ved 40 °C under vakuum og vejes. Tørringen fortsættes til konstant vægt.

2. DATA

2.1. Test udført med kun én prøvestørrelse

Resultaterne for hver enkelt kolbe og gennemsnittet for de tre kolber anføres i masseenheder pr. volumen opløsning (typisk mg/l) eller masse pr. masse polymerprøve (typisk mg/g). Desuden anføres prøvens vægttab (beregnet som vægten af det opløste stof divideret med prøvens begyndelsesvægt). De relative standardafvigelser (RSD) beregnes. Der anføres enkelttal for den samlede stofmængde (polymer + nødvendige additiver) og for polymer alene (dvs. efter subtraktion af bidraget fra disse additiver).

2.2. Test udført med to forskellige prøvestørrelser

De enkelte TOC-værdier for de vandige ekstrakter fra de to tredobbeltforsøg og gennemsnitsværdien for hvert forsøg anføres i masseenheder pr. volumen opløsning (typisk mg C/l) eller masse pr. masse polymerprøve (typisk mg C/g).

Ingen forskel mellem resultaterne for højt og lavt forhold mellem prøve og vand er tegn på, at alle ekstraherbare komponenter faktisk er ekstraheret. I så fald er direkte analyse normalt ikke påkrævet.

Vægten af hver enkelt remanens anføres, også i procent af den oprindelige prøve. Der beregnes et gennemsnit for hvert forsøg. Det procentvise indhold af opløselige og ekstraherbare stoffer i den oprindelige prøve er givet ved forskellen mellem 100 og de fundne procenttal.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

3.1.1. *Teststof*

— foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder, indhold af lavmolekylære bestanddele).

3.1.2. *Forsøgsbetingelser*

— beskrivelse af den anvendte fremgangsmåde og forsøgsbetingelserne

— beskrivelse af analyse- og detekteringsmetoder.

3.1.3. *Resultater*

— resultaterne for opløselighed/ekstraherbarhed i mg/l; enkeltværdier og gennemsnit for ekstraktionsforsøgene i de forskellige opløsninger, opdelt på polymer og urenheder, additiver mv.

— resultaterne for opløselighed/ekstraherbarhed i mg/g polymer

— TOC-værdier for vandige ekstrakter, vægt af opløst stof og beregnet procentværdi, hvis målt

— pH af hver enkelt prøve

— oplysninger om blindprøver

— oplysninger om teststoffets eventuelle kemiske ustabilitet både under testproceduren og under analyseringen

— alle oplysninger, der har betydning for fortolkning af resultaterne.

4. REFERENCER

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

DA

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER

Bruxelles, den 29.10.2003
KOM(2003) 644 endelig

2003/0256(COD)
2003/0257(COD)

DEL IV - Bilag X del B til forslaget til forordning

.

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS FORORDNING

om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) {om persistente organiske miljøgifte}

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

(forelagt af Kommissionen)

{SEC(2003 1171}

»AFSNIT B: METODER TIL BESTEMMELSE AF TOKSICITET OG ANDRE SUNDHEDSVIRKNINGER

GENEREL INDLEDNING: AFSNIT B

B. GENERELLE DEFINITIONER PÅ TERMER, DER ER ANVENDT I TESTMETODERNE I DETTE BILAG

i) **Akut toksicitet:** de skadelige virkninger, der optræder inden for et givet tidsrum (sædvanligvis 14 dage) efter udsættelse for en enkelt dosis af et teststof.

ii) **Tydelige tegn på toksicitet:** generel term til beskrivelse af klare tegn på toksicitet efter indgift af teststoffet. Disse tegn bør være tilstrækkelige som grundlag for risikovurdering og være af en sådan art, at en forøgelse af dosen kan forventes at resultere i udvikling af alvorlige tegn på toksicitet og sandsynlighed for dødelighed.

iii) **Dosis:** mængden af indgivet teststof. Dosis udtrykkes som vægt (gram eller milligram) eller som vægt af teststoffet pr. vægtenhed af forsøgsdyr (f.eks. mg pr. kg legemsvægt) eller som konstante koncentrationer i foderet (milliontedele eller mg pr. kg foder).

iv) **Den kritiske dosis:** den højeste af de fire fastdosisniveauer, som kan indgives, uden at det medfører stofrelateret dødelighed (aflivning af etisk årsag).

v) **Dosering:** generel term, der omfatter dosis, dosishyppighed og doseringens varighed.

vi) LD_{50} (middel letal dosis): den statistiske bestemte enkeltdosis af et teststof, som kan forventes at forårsage 50 % af forsøgsdyrenes død. LD_{50}-værdier udtrykkes som vægt af teststof pr. vægtenhed af forsøgsdyr (mg/kg).

vii) LC_{50} (middel letal koncentration): den statistiske bestemte koncentration af et stof, som kan forventes at forårsage 50 % af forsøgsdyrenes død enten under eksponeringen eller inden for et fastsat tidsrum efter eksponering i en bestemt periode.

LC_{50}-værdier udtrykkes som vægt af teststof pr. luftvolumenenhed ved standardbetingelser (mg/liter).

viii) **NOAEL:** forkortelse for no observed adverse effect level, dvs. den højeste dosis eller det højeste eksponeringsniveau, hvor der ikke iagttages skadelige behandlingsrelaterede resultater.

ix) **Toksicitet ved gentagen dosering/subkronisk toksicitet:** de skadelige virkninger, som iagttages på forsøgsdyr som følge af dagligt gentagen indgift af eller eksponering for et kemisk stof gennem en lille del af dyrenes forventede levetid.

x) **Masikmal tolerabel dosis (MTD):** den højeste dosis, som har toksiske virkninger uden dog i væsentlig grad at påvirke overlevelsesgraden i det forsøg, hvor den anvendes.

xi) **Hudirritation:** dannelse af inflammatoriske forandringer i huden som følge af applikation af et teststof.

xii) **Øjenirritation:** dannelse af forandringer i øjet som følge af applikation af et teststof på øjeæblet.

xiii) **Hudsensibilisering:** (allergisk kontakteksem): immunologisk udløst hudreaktion på et teststof.

xiv) **Ætsning af huden:** dannelse af irreversibel vævsskade i huden efter applikation af et teststof i et tidsrum fra tre minutter til fire timer.

xv) **Toksikokinetik:** undersøgelse af teststoffers absorption, distribution, metabolisme og udskillelse.

xvi) **Absorption:** den (eller de) proces(ser), hvorved et teststof trænger ind i kroppen.

xvii) **Udskillelse:** den (eller de) proces(ser), hvorved et teststof og/eller dets stofskifteprodukter udskilles af kroppen.

xviii) **Distribution:** den (eller de) proces(ser), hvorved det absorberede teststof og/eller dets stofskifteprodukter cirkulerer i og udskilles fra forskellige organer og væv i kroppen.

xix) **Metabolisme:** den (eller de) proces(ser), der forårsager strukturelle ændringer i teststoffet i kroppen enten ved enzymatiske eller non-enzymatiske reaktioner.

B.1 Akut toksicitet, toksicitet ved gentagen dosis, subkronisk toksicitet og kronisk toksicitet

Et stofs akutte toksiske virkninger og dets toksiske virkninger på enkelte organer eller hele organismen kan vurderes med en række toksicitetstests (metode B.1-B.5), hvorfra der efter en enkelt dosis kan udledes et foreløbigt tegn på toksicitet.

Afhængigt af stoffets toksicitet kan der anvendes en grænsetest i stedet for en fuldstændig LD_{50}-test: der er dog ikke specificeret nogen grænsetest for inhalationsundersøgelser, da det ikke har været muligt at definere en enkelt grænseværdi for eksponering ved inhalation.

Der anvendes så vidt muligt metoder, der bruger færrest mulige dyr eller mindsker dyrenes lidelser, f.eks. fastdosismetoden (metode B.1.bis) og metoden til klassificering som akut toksisk (metode B.1.ter). Ved niveau 1-testning kan en undersøgelse på en anden dyreart supplere konklusionerne af den første undersøgelse. I så fald kan der anvendes en standardtestmetode, eller metoden kan tilpasses til et mindre antal dyr.

Testen for toksicitet ved gentagen dosis (metode B.7, B.8 og B.9) omfatter vurdering af toksiske virkninger ved gentagen eksponering. Der lægges vægt på omhyggelige kliniske iagttagelser af dyrene, så der udledes flest mulige oplysninger af testen. Med disse tests skulle det være muligt at identificere målorganerne for toksicitet og de toksiske og ikke-toksiske doser. Der kan være behov for mere tilbundsgående undersøgelser af disse aspekter i langtidsundersøgelser (metode B.26-B.30 og B.33).

B.II Mutagenicitet — genotoksicitet

Ved mutagenicitet menes induktion af vedvarende, overførbare ændringer i mængden eller strukturen af cellers eller organismers genetiske materiale. Disse ændringer, »mutationer«, kan berøre et enkelt gen eller gen-segmenter, en sammenhængende række gener eller hele kromosomer. Virkningerne på hele kromosomer kan bestå i ændringer i disses struktur og/eller antal.

Et stofs mutagene aktivitet vurderes med in vitro-tests for gen(punkt)mutationer i bakterier (metode B.13/14) og/eller for strukturelle kromosomforandringer i pattedyrceller (metode B.10).

In vivo-metoder kan også accepteres, f.eks. mikronucleustesten (metode B.12) eller analyse af knoglemarvsceller i metafasen (metode B.11). Medmindre der foreligger kontraindikationer, bør in vitro-metoder imidlertid klart foretrækkes.

Ved fremstilling af store mængder kan der kræves supplerende undersøgelser til yderligere påvisning af mutagenicitet eller præ-screening for carcinogenicitet og/eller til udførelse eller opfølgning af en risikovurdering; disse undersøgelser kan anvendes til flere formål: til at bekræfte resultater, der er indhentet i basisundersøgelserne; til at analysere endepunkter, der ikke er undersøgt i basisundersøgelserne, og til at påbegynde eller udvide in vivo-undersøgelser.

Derfor omfatter metode B.15-B.25 både in vivo og in vitro eukariotiske systemer samt en udvidet række biologiske endepunkter. Disse tests giver oplysning om punktmutationer og andre endepunkter i organismer, der er mere komplekse end de bakterier, som bruges i basisundersøgelserne.

Når man planlægger et supplerende program til undersøgelse af mutagen effekt, bør det udformes således, at det giver relevant yderligere viden om det pågældende stofs mutagene og/eller carcinogene potentiale.

Hvilke undersøgelser der er hensigtsmæssige i konkrete tilfælde, afhænger af talrige faktorer, herunder også stoffets kemiske og fysiske egenskaber, resultaterne af de indledende bakteriologiske og cytogenetiske tests, stoffets omsætning og indflydelse på stofskifteprocesserne, resultaterne af andre toksikologiske undersøgelser og den eksisterende viden om stoffets anvendelse. Valget af test bør derfor, i betragtning af de varierende faktorer der skal tages hensyn til, ikke underlægges et stramt skema.

Direktiv 93/67/EØF indeholder visse generelle principper for teststrategien; den tekniske vejledning i risikovurdering indeholder mere detaljerede teststrategier, som ikke desto mindre er fleksible og kan tilpasses de konkrete omstændigheder.

Metoder til yderligere undersøgelser er anført nedenfor, opdelt efter deres vigtigste genetiske endepunkt:

Undersøgelser af gen(punkt)mutationer

a) Fremad- eller tilbagemutationsundersøgelser med anvendelse af eukaryotiske mikroorganismer (Saccharomyces cerevisiae) (metode B.15).

b) In vitro-undersøgelser af fremadmutation i pattedyrceller (metode B.17).

c) Den kønsbundne recessive letale test i Drosophila melanogaster (metode B.20).

d) In vivo somatisk cellemutationstest: spottest i mus (metode B.24).

Undersøgelser af kromosomforandringer

a) In vivo cytogenetiske undersøgelser i pattedyr. Det bør overvejes at foretage in vivo analyser af knoglemarvsceller i metafase, hvis de ikke er foretaget i den indledende vurdering (metode B.11). Endvidere kan in vivo cytogenetiske undersøgelser af kønsceller inddrages (metode B.23).

b) In vitro cytogenetiske undersøgelser i pattedyrceller, hvis de ikke er foretaget i den indledende vurdering (metode B.10).

c) Dominant letal test i gnavere (metode B.22).

d) Arvelig translokation hos mus (metode B.25).

Genotoksiske virkninger — virkninger på DNA

Genotoksicitet, kendetegnet ved potentielt skadelige virkninger på det genetiske materiale, som ikke nødvendigvis er forbundet med mutagenicitet, kan vise sig ved induceret DNA-beskadigelse uden direkte tegn på mutation. Følgende metoder med anvendelse af eukaryotiske mikroorganismer eller pattedyrceller kan være velegnede til sådanne undersøgelser:

a) Mitotisk rekombination i Saccharomyces cerevisiae (metode B.16).

b) DNA-skade og DNA-reparation — unscheduled DNA synthesis i pattedyrceller (in vitro) (metode B.18).

c) Søsterkromatidombytning i pattedyrceller (in vitro) (metode B.19).

Alternative metoder til undersøgelse for kræftfremkaldende potentiale

Der findes tests for pattedyrcellers transformation, som måler et stofs evne til at fremkalde morfologiske og adfærdsmæssige ændringer i cellekulturer, der menes at være forbundet med maligne transformationer — in vivo (metode B.21). Der kan bruges en række forskellige celletyper og transformationskriterier.

Vurdering af risikoen for arvelige effekter i pattedyr

Der findes metoder til måling af arvelig effekt i intakte pattedyr, frembragt af gen(punkt)mutationer, som f.eks. i specifik locus test med anvendelse af mus, til måling af kønscellemutation i første generation (ikke medtaget i dette bilag) eller til måling af kromosomforandringer, som f.eks. i arvelig translokationstests i mus (metode B. 25). Sådanne metoder kan anvendes ved vurdering af den eventuelle humangenetiske risiko ved et stof. I betragtning af disse undersøgelsers komplekse karakter og det meget store antal dyr, der er behov for, især til specifik locus test, skal der være vægtige grunde til at gennemføre disse undersøgelser.

B.III **Carcinogenicitet**

Kemiske stoffer kan beskrives som genotoksiske eller ikke-genotoksiske carcinogener, afhængigt af den formodede virkningsmekanisme.

Mutagenicitets/genotoksicitetsundersøgelserne kan give foreløbige oplysninger om et stofs genotoksiske kræftfremkaldende potentiale. Yderligere oplysninger kan fås med tests for toksicitet ved gentagen dosis, for subkronisk toksicitet eller kronisk toksicitet. Toksicitetstesten med gentagen dosis, metode B.7, og længerevarende undersøgelser med gentagen dosis omfatter vurdering af histopatologiske ændringer, der er iagttaget i toksicitetstests med gentagen dosis, f.eks. hyperplasi i visse væv. Disse undersøgelser og toksikokinetiske oplysninger kan anvendes til at påvise kemiske stoffer med carcinogent potentiale, som eventuelt bør undersøges yderligere i en carcinogenicitetstest (metode B.32) eller ofte i en kombineret undersøgelse for kronisk toksicitet/carcinogenicitet (metode B.33).

B.IV **Reproduktionstoksicitet**

Reproduktionstoksicitet kan påvises på forskellige måder (f.eks. mindskelse af reproduktionsfunktionen eller -evnen hos hanner og hunner, identificeret som »virkninger på fertiliteten«, eller induktion af ikke-arvelige skadelige virkninger på afkommet, identificeret som »udviklingstoksicitet«, der også omfatter teratogenicitet og virkninger under laktation.

For teratogenicitetsundersøgelserne, som indgår i udviklingstoksicitetstestningen, er testmetoden (metode B.31) primært beregnet på oral indgift. Som alternativ kan andre indgiftsveje anvendes, afhængigt af teststoffets fysiske egenskaber eller den sandsynlige eksponeringsvej for mennesker. I sådanne tilfælde tilpasses testmetoden under hensyntagen til de relevante elementer i 28 dages-undersøgelserne.

Hvor der kræves en reproduktions (fertilitets) test over tre generationer, kan den beskrevne metode til reproduktionstest i to generationer (metode B.35) udvides med en tredje generation.

B.V **Neurotoksicitet**

Neurotoksicitet kan påvises på forskellige måder, f.eks. funktionelle ændringer og/eller strukturelle biokemiske ændringer i det centrale eller perifere nervesystem. Tests for akut toksicitet kan give et foreløbigt indicium for neurotoksicitet. Toksicitetstesten med gentagen dosis, metode B.7, omfatter vurdering af neurotoksikologiske virkninger; det er vigtigt, at der foretages omhyggelige kliniske observationer af dyrene, så der udledes mest mulig information heraf. Metoden kan bruges til at identificere kemiske stoffer med neurotoksisk potentiale, som eventuelt bør underkastes yderligere tilbundsgående undersøgelser. Derudover er det vigtigt at være opmærksom på stoffernes evne til at forårsage specifikke neurotoksiske effekter, som ikke er påvist i andre toksicitetsundersøgelser. F.eks. et det påvist, at visse organiske phosphorforbindelser kan forårsage forsinket neurotoksicitet; de kan vurderes med metode B.37 og B.38 efter enkelt eller gentagen dosis.

B.VI **Immunotoksicitet**

Immunotoksicitet kan påvises på forskellige måder, f.eks. immunosuppression og/eller skærpelse af immunsystemets følsomhed, hvilket fremkalder overfølsomhed eller induceret autoimmunitet. Toksicitetstesten med gentagen dosis, metode B.7, omfatter vurdering af immunotoksiske effekter. Denne metode kan bruges til at identificere kemiske stoffer med immunotoksisk potentiale, som eventuelt bør undersøges yderligere.

B.VII **Toksikokinetik**

Toksikokinetiske undersøgelser er en hjælp til fortolkning og vurdering af toksicitetsdata. Formålet med disse undersøgelser er at belyse særlige aspekter af den testede kemiske forbindelses toksiske virkning, og undersøgelsesresultaterne kan være til støtte ved udformning af yderligere toksikologiske undersøgelser. Det er ikke hensigten med disse undersøgelser i alle tilfælde at bestemme alle parametre. Kun i sjældne tilfælde vil det være nødvendigt at gennemføre hele rækken af toksikokinetiske undersøgelser (absorption, udskillelse, distribution og stofskifte). For en række kemiske forbindelsers vedkommende kan det være tilrådeligt at ændre denne rækkefølge, og det vil i nogle tilfælde være tilstrækkeligt at teste en enkelt dosis (metode B.36).

Oplysninger om den kemiske struktur og de fysisk-kemiske egenskaber kan også indicere, hvorledes absorptionen kan foregå, når der vælges en bestemt fremgangsmåde at administrere stoffet på, og de kan give oplysning om stoffets skæbne i stofskifteprocesser og fordeling i væv. Der kan også foreligge oplysninger om toksikokinetiske parametre fra tidligere undersøgelser af toksicitet og toksikokinetik.

C. BESKRIVELSE AF TESTSTOFFET

Teststoffets sammensætning, herunder de vigtigste urenheder, og dets relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder dets stabilitet, skal være kendt forud for enhver undersøgelse af toksicitet.

Teststoffets fysisk-kemiske egenskaber giver en række vigtige oplysninger for valget af administrationsmåde, udformningen af hver enkelt undersøgelse samt håndtering og opbevaring af teststoffet.

Forud for undersøgelsen bør der udvikles en analysemetode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af stoffet (herunder vigtige urenheder, såfremt dette er muligt) i doseringsmediet og i det biologiske materiale.

Alle oplysninger om teststoffets identitet, fysisk-kemiske egenskaber, renhed og adfærd medtages i testrapporten.

D. PASNING AF DYR

Ved toksicitetstests er det afgørende, at der føres nøje kontrol med testmiljøet, og at dyrene passes korrekt.

i) *Miljø*

Miljøet i forsøgsstalde og -bure skal afpasses efter dyrearten. For rotter, mus og marsvin er en rumtemperatur på 22 ± 3° C og en relativ luftfugtighed på 30-70 % passende; for kaniner bør temperaturen være på 20 ± 3° C og den relative luftfugtighed på 30-70 %.

Nogle forsøgsteknikker er særlig følsomme over for temperaturafvigelser, og i sådanne tilfælde indeholder beskrivelsen af testmetoden nærmere oplysninger om passende forsøgsbetingelser. Ved alle undersøgelser af toksiske virkninger skal temperaturen og luftfugtigheden kontrolleres, registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport.

Der bør anvendes kunstig belysning, som følger en rytme med tolv timers lys og tolv timers mørke. Oplysninger om belysningsrytmen registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport.

Medmindre andet er angivet i metoden, kan dyrene opbevares i bure hver for sig eller i små grupper af samme køn, dog højst fem dyr pr. bur.

I rapporter over dyreforsøg er det vigtigt at anføre, hvilken type bure der er anvendt, og hvor mange dyr der har været i hvert bur, såvel under eksponering for det kemiske stof som i en efterfølgende observationsperiode.

ii) *Fodring*

Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller. Hvis teststofferne indgives med foder, kan reaktioner mellem teststoffet og foderbestanddele medføre, at næringsværdien nedsættes. Muligheden af en sådan reaktion skal tages i betragtning, når forsøgsresultaterne fortolkes. Der kan anvendes normalt laboratoriefoder med ubegrænset forsyning af drikkevand. Valget af foder kan afhænge af, at teststoffet skal kunne iblandes foderet på passende måde, hvis teststoffet indgives med foderet.

Forureninger i foderet, som vides at influere på toksiciteten, må ikke forefindes i interfererende koncentrationer.

E. HENSYN VED ANVENDELSE AF FORSØGSDYR

Ved udarbejdelse af testmetoderne er der taget skyldigt hensyn til dyrenes velfærd. I det følgende er der givet nogle få eksempler; listen er altså ikke udtømmende. Den nøjagtige ordlyd og/eller de nøjagtige betingelser fremgår af de enkelte metoder:

— Til vurdering af akut toksicitet ved oral indgift bør to alternative metoder overvejes, nemlig »fastdosis-metoden« og »metoden til klassificering som akut toksisk«. Fastdosismetoden har ikke dødsfald som specifikt endepunkt. Metoden til klassificering som akut toksisk anvender gennemsnitligt 70 % færre forsøgsdyr end metode B.1 for akut oral toksicitet. Begge metoder resulterer i mindre smerte og lidelse end den klassiske metode.

— Antallet af forsøgsdyr reduceres til et videnskabeligt acceptabelt minimum, idet kun fem dyr af samme køn testes for hvert dosisniveau i forbindelse med metoderne B.1 og B.3; ti dyr (og kun fem til den negative kontrolgruppe) anvendes til bestemmelse af hudsensibilisering ved hjælp af maksimeringstest på marsvin (guinea pig maximumzation test) (metode B.6); antallet af forsøgsdyr til den positive kontrol i forbindelse med *in vivo*-testning af mutagenicitet reduceres ligeledes (metode B.11 og B.12).

— Dyrenes smerter og lidelser under forsøgene reduceres, idet dyr, der udviser alvorlige og vedvarende tegn på lidelse og smerte aflives humant; dosering af teststoffer på en måde, som vides at forårsage smerte og lidelse på grund af stoffernes ætsende eller lokalirriterende egenskaber, kan udelades (metode B.1, B.2 og B.3).

— Forsøg med alt for høje doser undgås ved indførelse af grænsetests, ikke blot i forsøg for akut toksicitet (metode B.1, B.2 og B.3), men ligeledes in vivo-forsøg for mutagenicitet (metode B.11 og B.12).

— En strategi for testning for irriterende egenskaber gør det nu muligt at undgå forsøg, eller forsøget kan reduceres til undersøgelse af et enkelt dyr, når der foreligger tilstrækkelig videnskabelig dokumentation.

En sådan videnskabelig dokumentation kan baseres på stoffets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af andre tidligere udførte tests eller resultaterne af velvaliderede in vitro tests. Hvis der f.eks. er gennemført en undersøgelse af akut dermal toksicitet med grænsetestdosis af stoffet (metode B.3), hvor der ikke er iagttaget hudirritation, kan yderligere testning for hudirritation (metode B.4) være unødvendig; materialer, som har udvist klart ætsende eller alvorlige hudirriterende egenskaber i en undersøgelse for hudirritation (metode B.4), bør ikke undersøges for øjenirritation (metode B.5).

F. ALTERNATIV TESTNING

Den Europæiske Union har sat sig som mål at udvikle og validere alternative metoder, som kan give oplysninger på samme niveau som de nuværende dyreforsøg, men som anvender færre dyr, forårsager mindre smerte, eller hvor brugen af dyr fuldstændig kan undgås.

Efterhånden som sådanne metoder udvikles, skal de så vidt muligt tages i anvendelse i forbindelse med risikobeskrivelse og efterfølgende klassifikation og etikettering baseret på den potentielle fare ved de pågældende stoffer.

G. VURDERING OG FORTOLKNING

Ved vurdering og fortolkning af resultaterne af dyreforsøg og in vitro-undersøgelser skal der tages hensyn til, at der er grænser for, i hvilket omfang de kan ekstrapoleres direkte til mennesker; dokumentation for skadelige virkninger på mennesker, hvor sådan foreligger, skal derfor anvendes til at bekræfte testresultaterne.

Testresultaterne kan anvendes til klassificering og etikettering af nye og eksisterende kemiske stoffer med hensyn til disses sundhedsvirkninger for mennesker på grundlag af deres iboende egenskaber, som påvist og kvantificeret med disse metoder. De tilsvarende kriterier for klassificering og etikettering i bilag VI er også baseret på endepunkterne i forsøgsprotokollerne for disse testmetoder.

Disse resultater kan også anvendes til risikovurderingsundersøgelser af nye og eksisterende stoffer, og passende undersøgelsesstrategier til disse formål er anført i de tilsvarende vejledninger.

H. LITTERATURHENVISNINGER

De fleste af disse metoder er udviklet inden for rammerne af OECD's program for retningslinjer for forsøgsvirksomhed (OECD-Test Guidelines) og bør udføres i overensstemmelse med principperne for god laboratoriepraksis, så der kan opnås størst mulig »gensidig accept af data«.

Yderligere oplysninger kan findes i henvisningerne i OECD-retningslinjerne og relevant litteratur, der er offentliggjort andetsteds.«

B.1 bis. AKUT TOKSICITET (ORAL INDGIFT) — FASTDOSIS-METODE

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIPPET I TESTMETODEN

Testen for akut toksicitet ved oral indgift giver oplysninger om de skadelige virkninger, der kan vise sig kort tid efter indtagelse af en enkelt dosis af teststoffet.

Den faste dosismetode gennemføres i to faser.

I en indledende observationsundersøgelse foretages en sekventiel undersøgelse af virkningerne af forskellige doser indgivet oralt ved hjælp af sonde til enkelte dyr af et køn. Observationsundersøgelsen giver oplysninger om forholdet mellem dosis og toksicitet, herunder et skøn over mindste dødelige dosis. Normalt bruges højst fem dyr i denne første fase.

I hovedundersøgelsen indgives stoffet oralt ved hjælp af sonde til grupper af fem handyr og fem hundyr ved et af de forud fastsatte dosisniveauer (5, 50, 500 eller 2 000 mg/kg). Den anvendte dosis beregnes på grundlag af observationsundersøgelsen, og er den dosis, der sandsynligvis vil medføre »tydelige tegn på toksicitet« (se punkt 1.2 Definitioner), men ingen dødsfald.

Efter indgift observeres virkningerne på forsøgsdyrene.

Når det først valgte dosisniveau fremkalder tydelige tegn på toksicitet, men ikke nogen stofrelateret dødelighed, er yderligere testning unødvendig.

Når der ikke konstateres tydelige tegn på toksicitet ved det valgte dosisniveau, bør stoffet testes igen med den dosis, som ligger lige over det først valgte dosisniveau. Når dyr dør, eller udviser en kraftig toksisk reaktion, som kræver human aflivning af dyrene, skal stoffet testes igen med den dosis, som ligger lige under det først valgte dosisniveau.

Denne fremgangsmåde gør det muligt at identificere den »kritiske dosis« (se punkt 1.2 Definitioner), dvs. den højeste af de forud fastsatte doser, som dyrene kan udsættes for, uden at det medfører dødsfald (herunder human aflivning).

Dyr, som udviser alvorlige og vedvarende tegn på lidelse og smerte, må evt. aflives humant. Dosering af teststoffer på en måde, som man ved giver udtalt smerte eller lidelse på grund af ætsning eller lokalirriterende egenskaber, er overflødig.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

1.6.1.1. *Forsøgsdyr*

Rotter er de foretrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer.

Der benyttes rotter af almindeligt anvendte stammer. For såvel han- som hunrotter gælder det, at begyndelsesvægten af de dyr, som anvendes ved et forsøg, ikke må variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst 5 dage, inden forsøget begyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr skal fordeles randomiseret i grupper til observationsundersøgelsen og hovedundersøgelsen. I praksis kan en gruppe af hvert køn være nok til hovedundersøgelsen.

1.6.1.2. *Dosisforberedelse og indgivelse*

Når det er nødvendigt, opløses eller opslemmes teststoffet i et passende vehikel. Det anbefales, at der så vidt muligt anvendes en vandig opløsning, og hvis dette ikke er muligt, en opløsning i vegetabilsk olie, en opløsning i andre vehikler eller evt. en suspension. Ved ikke-vandige vehikler bør vehiklets relevante karakteristika være kendt eller, hvis de ikke kendes, bestemmes forud for eller i forbindelse med forsøget. Hos gnavere bør volumen normalt ikke overstige 10 ml/kg legemsvægt, undtagen ved anvendelse af vandige opløsninger, hvor op til 20 ml/kg kan anvendes. Forskelle i volumen skal gøres mindst mulig ved at justere koncentrationen og således sikre, at volumen er konstant ved alle doser.

Dyrene skal faste, inden teststoffet indgives. Rotter må ikke fodres natten før teststoffet indgives; der skal være fri adgang til drikkevand. Den følgende dag vejes dyrene, og teststoffet indgives i en enkelt dosis med mave-sonde. Hvis det ikke er muligt at give hele dosis på én gang, kan den gives i mindre portioner over et tidsrum, der ikke må overstige 24 timer. Når teststoffet er indgivet, kan man undlade at give dyrene foder i yderligere tre til fire timer. Hvis en dosis indgives i mindre portioner over et tidsrum, kan det være nødvendigt at give dyrene foder og vand afhængig af, hvor lang en periode der er tale om.

1.6.2. **Fremgangsmåde**

1.6.2.1. *Observationsundersøgelse*

Virkningerne af forskellige doser undersøges hos enkelte dyr. Normalt anvendes hundyr, medmindre der foreligger oplysninger om, at handyr er de mest følsomme. Doseringen er sekventiel, idet der skal gå mindst 24 timer, før en dosis gives til det næste dyr. Alle dyr observeres omhyggeligt for tegn på toksicitet i mindst syv dage. Hvis der efter syv dage stadig er tegn på moderat toksicitet, skal dyrene observeres i endnu syv dage. Følgende faste dosisniveauer er fastlagt : 5, 50, 500 og 2 000 mg/kg. Hvis det faste dosisniveau, som er valgt, ikke fremkalder alvorlig toksicitet, og det næstfølgende højere niveau medfører dødelighed, er det nødvendigt at undersøge et eller flere mellemliggende dosisniveauer. På denne måde skulle det være muligt at få oplysninger om det dosisniveau, som fremkalder tegn på toksicitet, og det mindste dosisniveau, der fremkalder dødelighed.

Man bør forsøge at vælge det faste dosisniveau på grundlag af resultater i forbindelse med lignende kemikalier. Såfremt sådanne oplysninger ikke foreligger, foreslås det, at der i første omgang anvendes en dosis på 500 mg/kg. Hvis der ikke fremkommer nogen tegn på toksicitet ved det faste dosisniveau, undersøges det næste højere dosisniveau. Hvis der ikke forekommer nogen dødelighed ved 2 000 mg/kg, er observationsundersøgelsen fuldført, og hovedundersøgelsen bør gennemføres ved dette dosisniveau. Hvis alvorlige virkninger, der nødvendiggør human aflivning viser sig ved det faste dosisniveau (f.eks. 500 mg/kg), gives den umiddelbart lavere dosis (f.eks 50 mg/kg) til et andet dyr. Hvis dette dyr overlever, kan andre dyr gives passende doser mellem de faste dosisniveauer. Normalt bør der ikke anvendes mere end fem dyr i denne undersøgelse.

1.6.2.2. *Hovedundersøgelse*

Der anvendes mindst 10 dyr (5 hundyr og 5 handyr) til hvert dosisniveau. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

Det er et princip i fastdosis-metoden, at der kun anvendes moderat toksiske doser. Indgift af dødelige doser af teststoffet skal undgås.

Det dosisniveau, som anvendes ved forsøget, skal vælges fra et af de fire faste dosisniveauer, nemlig 5, 50, 500 eller 2 000 mg/kg legemsvægt. Det niveau, som vælges først, skal være det niveau, som med størst sandsynlighed fremkalder tydelige tegn på toksicitet, men ingen stofrelateret dødelighed (herunder human

aflivning; dødsfald ved ulykke er ikke inkluderet, men skal registreres). Når et dosisniveau fremkalder tydelige tegn på toksicitet, men ingen stofrelateret dødelighed, er yderligere testning unødvendig.

Når der ikke fremkommer tydelige tegn på toksicitet efter indgift af den valgte dosis, skal stoffet testes igen ved det næste højere dosisniveau. Dyrene skal imidlertid holdes under observation indtil afslutningen af observationsperioden. Når en kraftig toksisk reaktion gør det påkrævet, at dyrene aflives humant, eller når der foreligger stofrelateret dødelighed, skal stoffet testes igen ved det næste lavere dosisniveau. Også her skal de dyr, som det ikke har været nødvendigt at aflive, holdes under observation i hele observationsperioden.

Efter indgift af teststoffet fortages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr.

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Dens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk. Den bør bestemmes ud fra toksiske reaktioner, tidspunktet for disses indtræden og restitutionsperiodens længde; den bør således forlænges, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, samt dødstidspunktet er vigtigt, navnlig hvis der er tendens til, at symptomerne på toksicitet indtræder med nogen forsinkelse.

Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst to gange den dag, hvor teststoffet indgives, og mindst én gang hver dag derefter. Dyr, som tydeligvis har smerter, eller som udviser alvorlige tegn på lidelse, skal aflives humant. Supplerende observationer er nødvendige i de første dage efter indgift af teststoffet, hvis dyrene fortsætter med at udvise tegn på toksicitet. Forsøget kan afsluttes, hvis det viser sig, at det først valgte dosisniveau var for højt.

Observationerne af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønster. Der bør navnlig foretages en omhyggelig observation for forekomst af rystelser, kramper, spytflåd, diarré, apati, søvn og bevidstløshed.

Dyrene vejes kort tid inden teststoffet indgives, dernæst én gang om dagen i de næste tre dage og én gang om ugen derefter. De dyr, som dør under forsøget, og de dyr, som overlever forsøget, vejes og obduceres. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

Undersøgelse af et andet eller i sjældne tilfælde et tredje dosisniveau kan være nødvendig, afhængig af resultaterne af forsøget med det først valgte dosisniveau.

Såfremt et stof fremkalder dødsfald ved 5 mg/kg (eller når en range finding study viser, at der sandsynligvis vil forekomme dødsfald ved dette dosisniveau), kan det være nødvendigt at foretage en yderligere undersøgelse af stoffets akutte toksicitet.

2. DATA

Data fra både observationsundersøgelsen og hovedundersøgelsen opstilles i tabelform, som for hvert testet dosisniveau viser: antal dyr ved begyndelsen af forsøget; antal dyr, der udviser tegn på toksicitet; antal dyr, som findes døde under forsøget, eller som aflives af humane årsager; en beskrivelse af de toksiske virkninger og for hovedundersøgelsens vedkommende af, hvorvidt der er konstateret tydelige stofrelaterede tegn på toksicitet; tidsforløbet for de toksiske virkninger og obduktionsfund. Ændringer i vægt skal beregnes og registreres, når et dyr lever mere end én dag efter indgift af teststoffet.

Dyr, som er aflivet af humane årsager på grund af stofrelateret lidelse og smerte, registreres som stofrelaterede dødsfald.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger for både observationsundersøgelsen og hovedundersøgelsen:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser

— dosisniveauer (med angivelse af typen af vehikel, hvor et sådant er anvendt, samt koncentration)

— samtlige resultater af alle de undersøgte dosisniveauer

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og dosis (dvs. antal doserede dyr; ændringer i vægt; antal døde dyr eller antal dyr, som er aflivet under forsøget, hvor noget sådant har fundet sted; antal dyr, som har vist tegn på toksicitet; art, sværhedsgrad og varighed af virkningerne)

— tidspunkt for fremkomst af symptomer på toksicitet og angivelse af, hvorvidt disse symptomer forsvinder igen

— dødstidspunktet efter doseringen, når dyr er døde eller er blevet aflivet, samt årsager til og kriterier for human aflivning af dyrene

— obduktionsfund

— evt. histopatologiske fund

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne, herunder tydelige tegn på toksicitet og det kritiske dosisniveau, som er blevet påvist under forsøget.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

DOSIS	RESULTATER	FORTOLKNING
5 mg/kg legemsvægt	Under 100 % overlevelse	Stoffer, som er MEGET TOKSISKE
	100 % overlevelse, men tydelige tegn på toksicitet	Stoffer, som er TOKSISKE
	100 % overlevelse, ingen tydelige tegn på toksicitet	Se resultaterne ved 50 mg/kg.
50 mg/kg legemsvægt	Mindre end 100 % overlevelse	Stoffer, som kan være TOKSISKE eller MEGET TOKSISKE.Se resultaterne ved 5 mg/kg.
	100 % overlevelse, men tydelige tegn på toksicitet	Stoffer, som er SKADELIGE.
	100 % overlevelse, ingen tydelige tegn på toksicitet	Se resultaterne ved 500 mg/kg.
500 mg/kg legemsvægt	Mindre end 100 % overlevelse	Stoffer, som kan være TOKSISKE eller SKADELIGE. Se resultaterne ved 50 mg/kg.
	100 % overlevelse, men tydelige tegn på toksicitet	Stoffer, som ikke menes at have nogen akut toksicitet af betydning
	100 % overlevelse, ingen tydelige tegn på toksicitet.	Se resultaterne ved 2 000 mg/kg.
2 000 mg/kg legemsvægt	Mindre end 100 % overlevelse	Se resultaterne ved 500 mg/kg.
	100 % overlevelse, med eller uden tydelige tegn på toksicitet.	Stoffer, som ikke har nogen akut toksicitet af betydning.

Se ligeledes den generelle indledning til del B (D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til del B (E).

»B.1.ter AKUT TOKSICITET (ORAL INDGIFT) — METODE TIL KLASSIFICERING SOM AKUT TOKSISK

1. METODE

1.1. Indledning

Denne metode giver oplysninger til brug for både risikovurdering og -klassificering.

I metoden anvendes tre faste doser på forskellige niveauer, der tillader, at et stof kan klassificeres på grundlag af undersøgelsesresultaterne. Endvidere giver proceduren i denne testmetode mulighed for at vælge tre supplerende faste doser, som enten kan anvendes som alternative muligheder ved visse beslutningspunkter eller til yderligere testning. Anvendelse af supplerende dose(r) kan overvejes, hvis en mere tilbundsgående analyse er ønskelig eller nødvendig.

Der anvendes faste udgangsdoser. Metoden tager ikke sigte på beregning af en nøjagtig LD_{50}, men giver mulighed for bestemmelse af et eksponeringsinterval, inden for hvilket dødelighed kan forventes, eftersom dødelig udgang for en del af dyrene stadig er det vigtigste endepunkt for denne test. Resultaterne af testen bør kunne anvendes til klassificering i henhold til kriterierne i bilag VI. Da denne fremgangsmåde er sekventiel, kan testens varighed være længere end den under B.1 beskrevne procedure. Den vigtigste fordel ved denne metode er, at den kræver færre dyr end både metoden for akut toksicitet (oral indgift) (B.1) og den alternative fastdosismetode (B.1.bis).

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Testmetodens princip

Stoffet indgives oralt til en gruppe forsøgsdyr på et af de fastsatte dosisniveauer. Stoffet afprøves med en trinvis fremgangsmåde, hvor der på hvert trin anvendes tre dyr af samme køn. Det er ikke nødvendigt at gennemføre en indledende observationsundersøgelse. Det næste trin afhænger af, om der indtræffer stofrelateret dødelighed blandt de behandlede dyr:

— der behøves ingen yderligere testning

— næste trin udføres med samme dosis, men med dyr af det andet køn

— næste trin udføres på det umiddelbart højere eller lavere dosisniveau.

1.4. Beskrivelse af testmetoden

1.4.1. *Forberedelser*

Unge, sunde, kønsmodne dyr udvælges vilkårligt, mærkes med henblik på individuel identifikation og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes, så dyrene kan tilpasse sig laboratoriebetingelserne. Dyrene kan anbringes sammen i bure efter køn og dosisniveau, men antallet af dyr pr. bur må ikke forringe muligheden for at foretage klare observationer af hvert enkelt dyr.

Teststoffet indgives dyrene i en enkelt dosis med mavesonde eller passende intubationsrør.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et passende vehikel. Det anbefales, at der så vidt muligt anvendes en vandig opløsning/opslæmning og, hvis dette ikke er muligt, en opløsning/emulsion i olie (f.eks. majsolie) eller eventuelt en opløsning i andre vehikler. Ikke-vandige vehiklers toksiske egenskaber skal være kendt eller bestemmes forud for testen.

Dyrene fastes, inden teststoffet indgives (f.eks. natten over for rotter eller tre til fire timer for mus); der skal være fri adgang til drikkevand.

1.4.2. *Forsøgsbetingelser*

1.4.2.1. Forsøgsdyr

Rotter er de fortrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Hundyr må ikke have født og må ikke være drægtige.

For såvel han- som hunrotter gælder det, at vægten af de anvendte dyr ikke må variere med mere end ±20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt ved forsøgets begyndelse.

1.4.2.2. Antal og køn

Der anvendes tre dyr af samme køn på hvert trin. Begge køn kan bruges på det første trin.

1.4.2.3. Dosisniveauer

Som udgangsdosis vælges et af følgende tre faste niveauer, 25, 200 og 2 000 mg/kg legemsvægt. Udgangsdosisniveauet bør være det niveau, som med størst sandsynlighed kan ventes at medføre dødelighed for i hvert fald nogle af de behandlede dyr. Afhængigt af udgangsdosis kan et af diagrammerne i bilag 1 anvendes.

Ved valg af køn og udgangsdosis bør alle foreliggende oplysninger anvendes, herunder oplysninger om struktur/aktivitetsforhold. Hvis det af oplysningerne kan sluttes, at der ikke er sandsynlighed for dødelighed ved det højeste dosisniveau (2 000 mg/kg legemsvægt), bør der gennemføres en grænsetest. Hvis der ikke foreligger oplysninger om teststoffet, anbefales det af hensyn til dyrenes velfærd at anvende en udgangsdosis på 200 mg/kg legemsvægt.

Der kan til tider være brug for mere nøjagtige oplysninger, end der kan opnås efter testen med de tre faste dosisniveauer på 25, 200 og 2 000 mg/kg legemsvægt. I så fald kan det overvejes at gennemføre yderligere testning med supplerende fastdosisniveauer på 5, 50 eller 500 mg/kg legemsvægt.

Doser, der vides at forårsage udtalt smerte eller lidelse på grund af ætsende eller stærkt lokalirriterende egenskaber, er overflødige.

Tidsrummet mellem behandling af de forskellige grupper afhænger af tidspunktet for, varigheden af og styrken af tegnene på toksicitet. Behandling af dyr af det andet køn eller behandling med den næste dosis bør udsættes, indtil der er sikkerhed for, at de tidligere behandlede dyr overlever.

1.4.2.4. Grænsetest

Der kan udføres en grænsetest med en dosis på 2 000 mg/kg legemsvægt med tre dyr af hvert køn. Optræder der teststofrelaterede dødsfald, kan det være nødvendigt at gennemføre en yderligere undersøgelse med en dosis på 200 mg/kg (eller 500 mg/kg) legemsvægt.

1.4.2.5. Observationsperiode

Dyrene skal normalt observeres i 14 dage, medmindre der indtræder dødsfald eller det af hensyn til dyrene er nødvendigt at fjerne dem fra undersøgelsen og aflive dem humant. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk. Den bør bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, tidspunktet for disses indtræden og restitutionsperiodens længde; den kan således forlænges, hvis det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, er vigtigt, navnlig hvis der er tendens til, at tegnene på toksicitet indtræder sent. Alle observationer registreres systematisk for hvert enkelt dyr.

1.4.3. *Fremgangsmåde*

Efter fasteperioden vejes dyrene forud for indgift af teststoffet. Når teststoffet er indgivet, kan man undlade at give dyrene foder i yderligere tre til fire timer. Hvis en dosis indgives fraktioneret over en periode, kan det være nødvendigt at give dyrene foder og vand afhængigt af, hvor lang en periode der er tale om.

Den største væskevolumen, som kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Hos gnavere bør volumen normalt ikke overstige 1 ml/100 g legemsvægt; for vandige opløsninger kan 2 ml/100 g legemsvægt imidlertid komme i betragtning. Volumenvariationer minimeres ved at justere koncentrationen for at sikre en konstant volumen ved alle dosisniveauer. Hvis én enkelt dosis ikke er mulig, kan dosis gives i mindre fraktioner over en periode på højst 24 timer.

Testproceduren er beskrevet indgående i bilag 1.

1.4.3.1. Generelle observationer

Der foretages grundige kliniske observationer mindst to gange den dag, hvor teststoffet indgives, eller hyppigere, hvis dyrenes reaktion på behandlingen indicerer dette, og mindst en gang om dagen derefter. Døende dyr og dyr, der viser tegn på alvorlig smerte og lidelse, aflives humant. Dyr, der aflives af humane grunde, behandles på samme måde som dyr, der er døde under forsøget.

Hvis dyr aflives af humane årsager eller findes døde, registreres dødstidspunktet så nøjagtigt som muligt. Der kræves supplerende observationer, hvis dyrene fortsat udviser tegn på toksicitet. Observationerne skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønster. Der foretages en omhyggelig observation for forekomst af rystelser, kramper, spytflod, diarré, aparti, søvn og bevidstløshed.

Alle observationer registreres systematisk for hvert enkelt dyr.

1.4.3.2. Legemsvægt

Alle dyrene vejes, kort tid inden teststoffet indgives, og dernæst mindst én gang om ugen. Vægtforandringer beregnes og registreres. Ved testens afslutning vejes overlevende dyr, inden de aflives humant.

1.4.3.3. Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene, herunder de dyr, der dør under forsøget, eller som fjernes fra undersøgelsen, underkastes makroskopisk undersøgelse. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres for hvert dyr. Der kan også foretages en mikroskopisk undersøgelse af organer, der udviser tegn på makroskopisk patologi, på dyr, der overlever mindst 24 timer, da en sådan undersøgelse kan give nyttige oplysninger.

2. DATA

Der registreres data for hvert enkelt dyr. Derudover opstilles alle data i tabelform, som for hver testgruppe viser: antal dyr, der er anvendt; antal dyr, der udviser tegn på toksicitet; antal dyr, som findes døde under forsøget, eller som aflives af humane årsager; dødstidspunktet for de enkelte dyr; en beskrivelse af og tidsforløbet for de toksiske virkninger og reversibilitet samt obduktionsfund.

Bilag 2 indeholder generelle retningslinjer for fortolkning af resultaterne med henblik på klassificering.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapport

Forsøgsrappporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— art/stamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis denne kendes

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, laboratoriemiljø, foder osv.

— hvert enkelt dyrs vægt ved forsøgets begyndelse, herefter med ugentlige mellemrum og ved forsøgets afslutning.

Forsøgsbetingelser:

— begrundelse for valg af vehikel, medmindre det er vand

— nærmere oplysninger om indgift af teststoffet, herunder dosisvolumen og doseringstidspunkt

— oplysninger om foder- og vandkvalitet (herunder type/oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valg af udgangsdosis.

Resultater:

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og dosisniveau for hvert enkelt dyr (dvs. dyr, som har vist tegn på toksicitet, herunder død, virkningernes art, sværhedsgrad og varighed)

— tidspunkt og tidsforløb for tegn på toksicitet og disses reversibilitet, for hvert enkelte dyr

— obduktionsfund og eventuelle histopatologiske fund for hvert enkelt dyr.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. LITTERATURHENVISNINGER

Denne metode svarer til TG 423 fra OECD.

BILAG 1

FORSØGSPROCEDURE

1. Som angivet under punkt 1.4.2.3, bør udgangsdosis være den dosis, som forventes at medføre dødelighed for i hvert fald nogle af de doserede dyr. Oplysninger, der kan anvendes ved valg af udgangsdosis:
   - — data om fysisk-kemiske egenskaber
   - — struktur/aktivitetsforhold
   - — alle data fra andre toksicitetstests
   - — forventet brug af teststoffet.

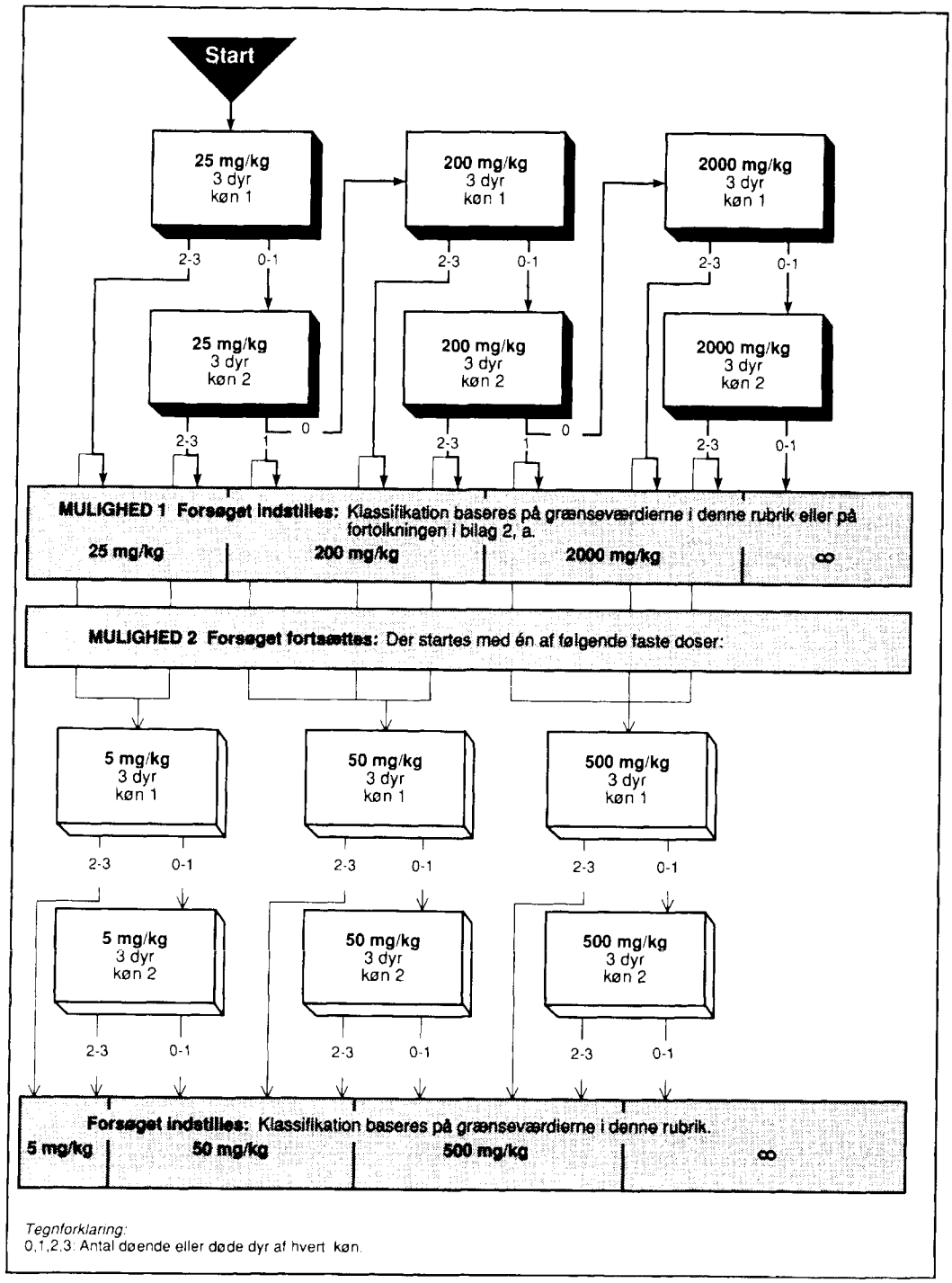
2. For hver udgangsdosis angives fremgangsmåden i de respektive forsøgsdiagrammer, der er anført i dette bilag. Arbejdsgangen er anført med pile og afhænger af antallet af humant aflivede dyr eller døde dyr.

3. Hvis kun ét dyr af det andet køn dør ved en udgangsdosis på 25 eller 200 mg/kg legemsvægt, foretages der normalt ikke yderligere testning. Hvis der imidlertid ikke observeres tegn på toksicitet hos de andre fem dyr, bør der under obduktion tages hensyn til muligheden for, at dødeligheden ikke er stofrelateret. I dette tilfælde bør testen videreføres med dosis på det efterfølgende højere niveau.

4. Hvis ét dyr af hvert køn dør ved en dosis på 2 000 mg/kg legemsvægt, kan LD_{50}-værdien formodes at være højere end 2 000 mg/kg legemsvægt. Da dette imidlertid er et grænseresultat, bør reaktionen fra de resterende to dyr af hvert køn observeres nøje, og forekommer der distinkte og klare tegn på toksicitet hos disse dyr, kan det medføre klassificering af stoffet svarende til en LD_{50}-værdi på 2 000 mg/kg legemsvægt eller mindre eller begrunde yderligere testning på samme niveau.

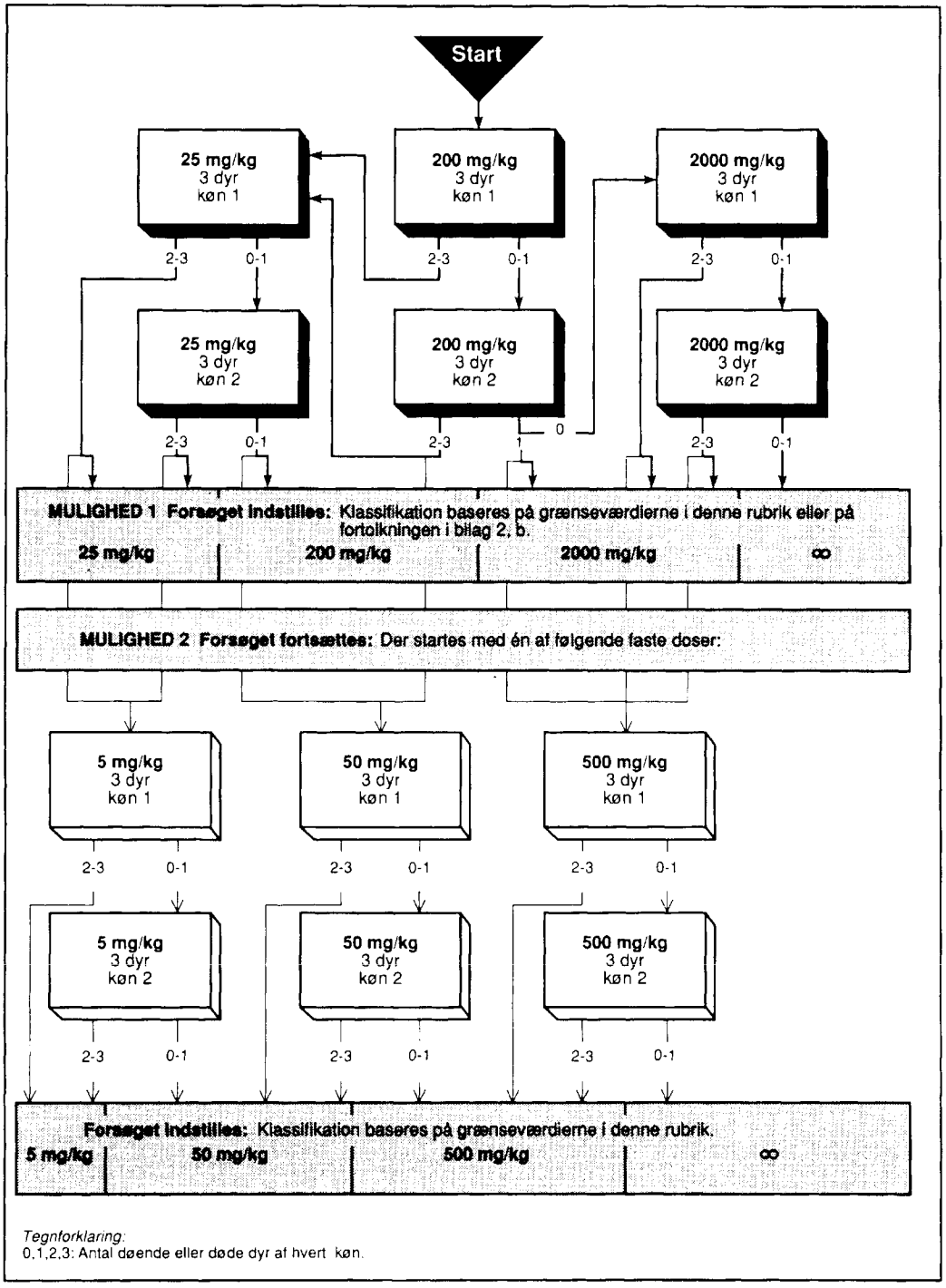
5. Fremgangsmåden giver mulighed for testning med yderligere tre faste doser (mulighed 2). Denne mulighed kan enten anvendes til at vælge en alternativ dosis på et givet beslutningspunkt eller til yderligere testning efter afslutning af den igangværende test (mulighed 1). Mulighed 1-fremgangsmåden er angivet med kraftigt markerede pile, mens mulighed 2-fremgangsmåden er angivet med tynde pile.

a) Forsøgsprocedure med udgangsdosis på 25 mg/kg legemsvægt



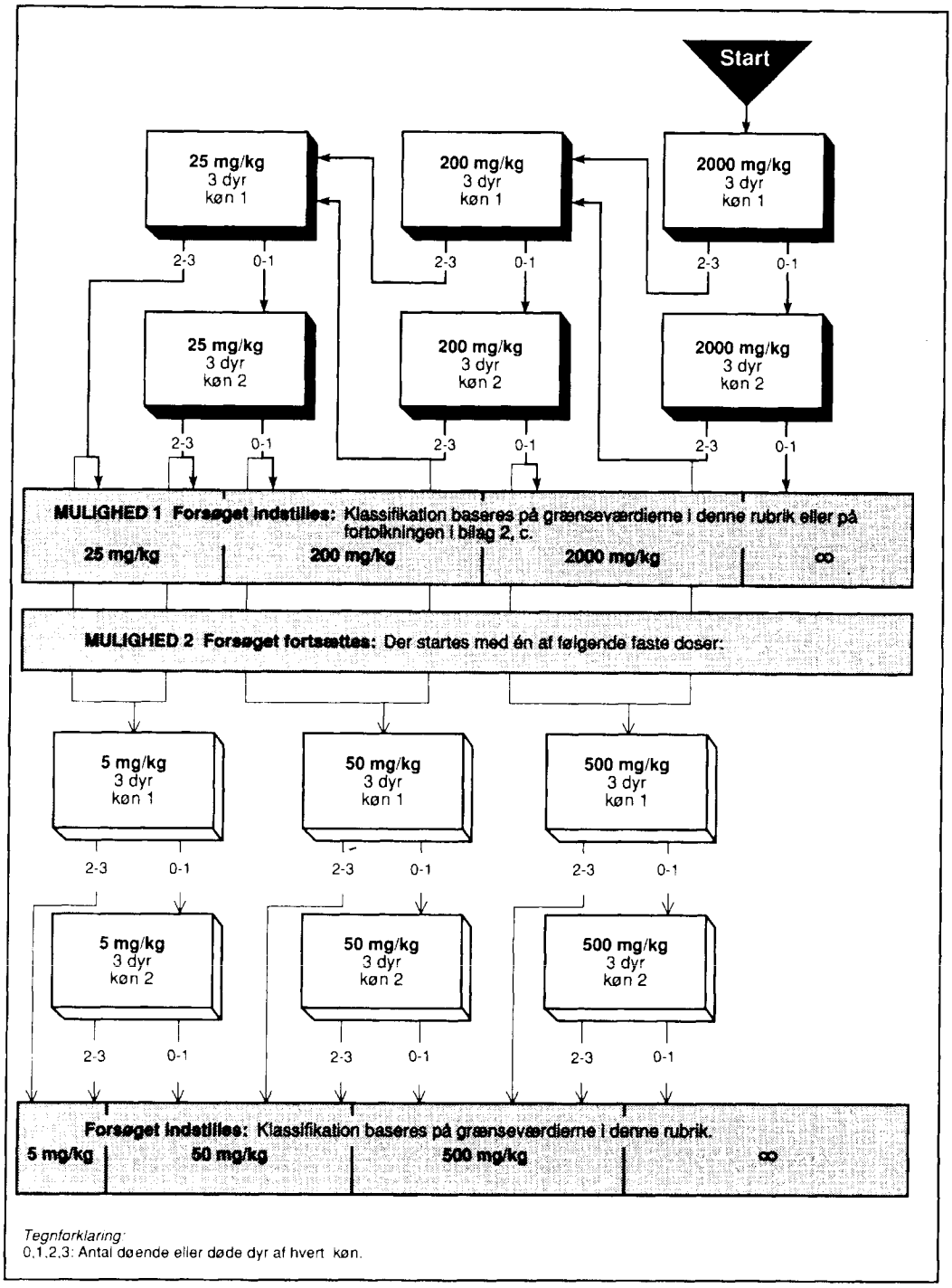
Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

b) Fremgangsmåde med udgangsdosis på 200 mg/kg legemsvægt



Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

c) Forsøgsprocedure med udgangsdosis på 2 000 mg/kg legemsvægt



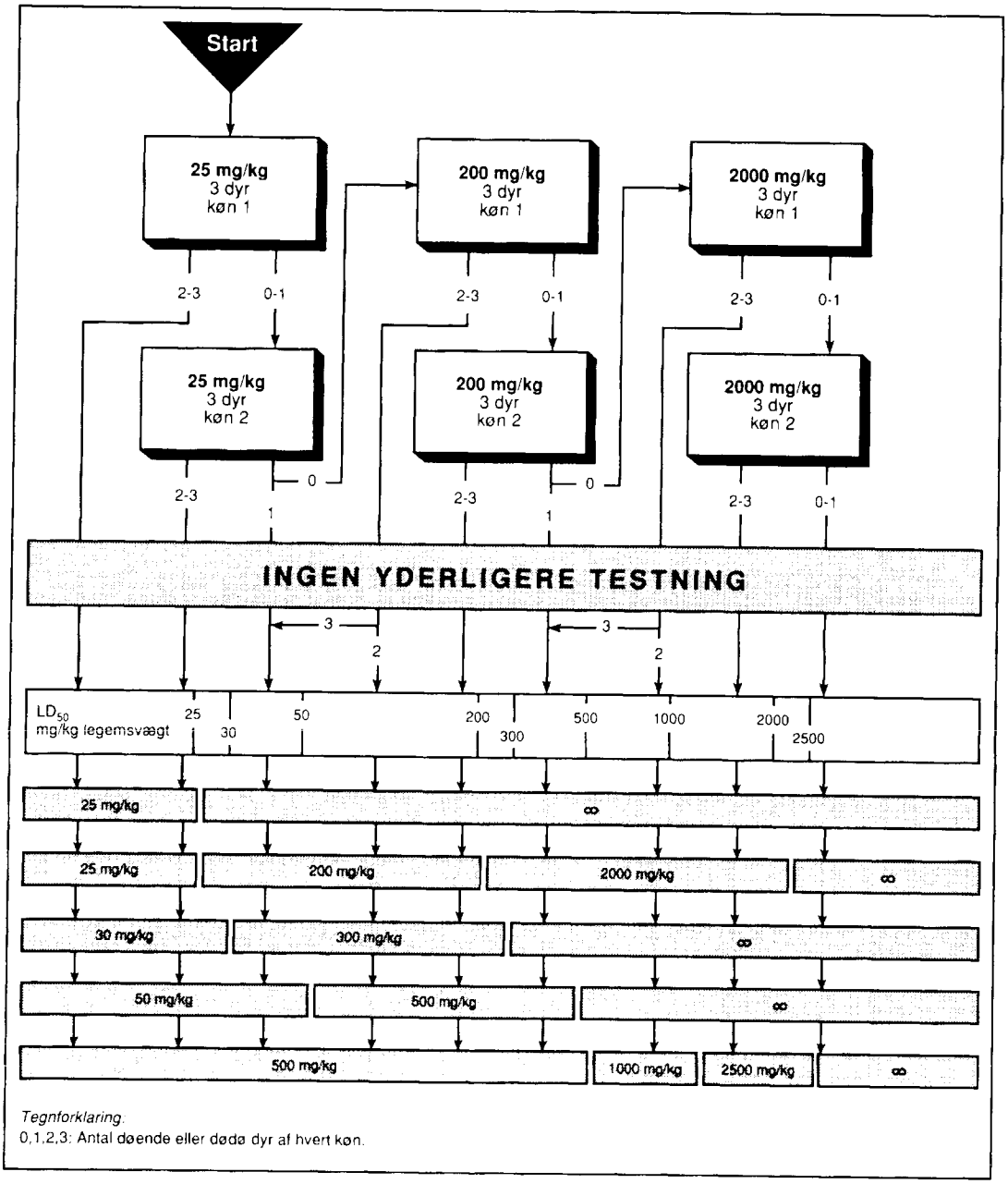
Tegnforklaring:
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

FORTOLKNING AF RESULTATERNE BASERET PÅ MULIGHED 1-TESTNING

De grå rubrikker »ingen yderligere testning« i diagrammerne i dette bilag viser de grænseværdier, der tjener til klassifikation. Efter forsøgsproceduren i mulighed 1 følges den relevante pil indtil den relevante grå rubrik.

a) **Fortolkning af resultaterne baseret på mulighed 1-testning**

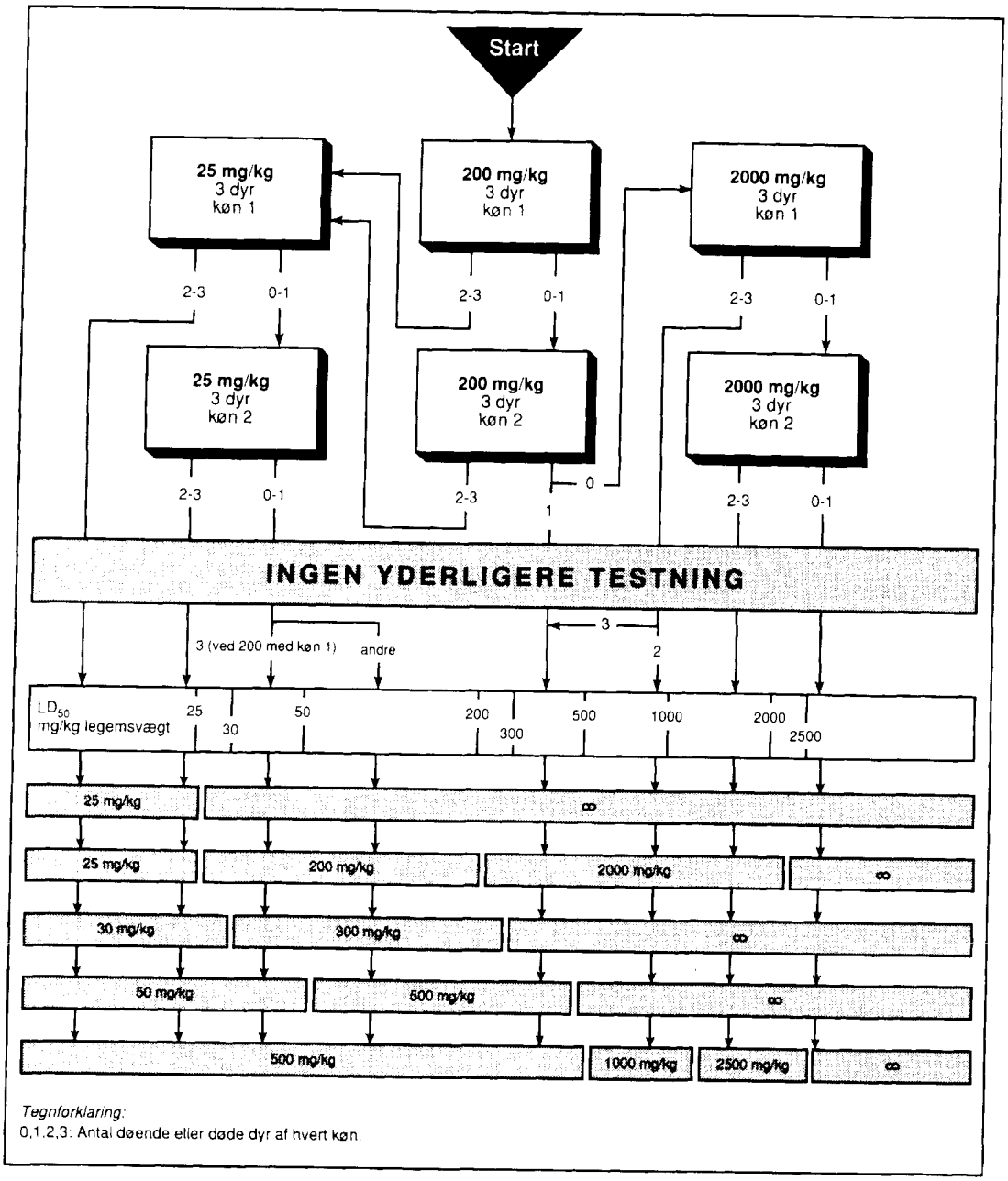
Udgangsdosis: 25 mg/kg legemsvægt



Tegnforklaring.
0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

b) **Fortolkning af resultaterne baseret på mulighed 1-testning**

Udgangsdosis: 200 mg/kg legemsvægt

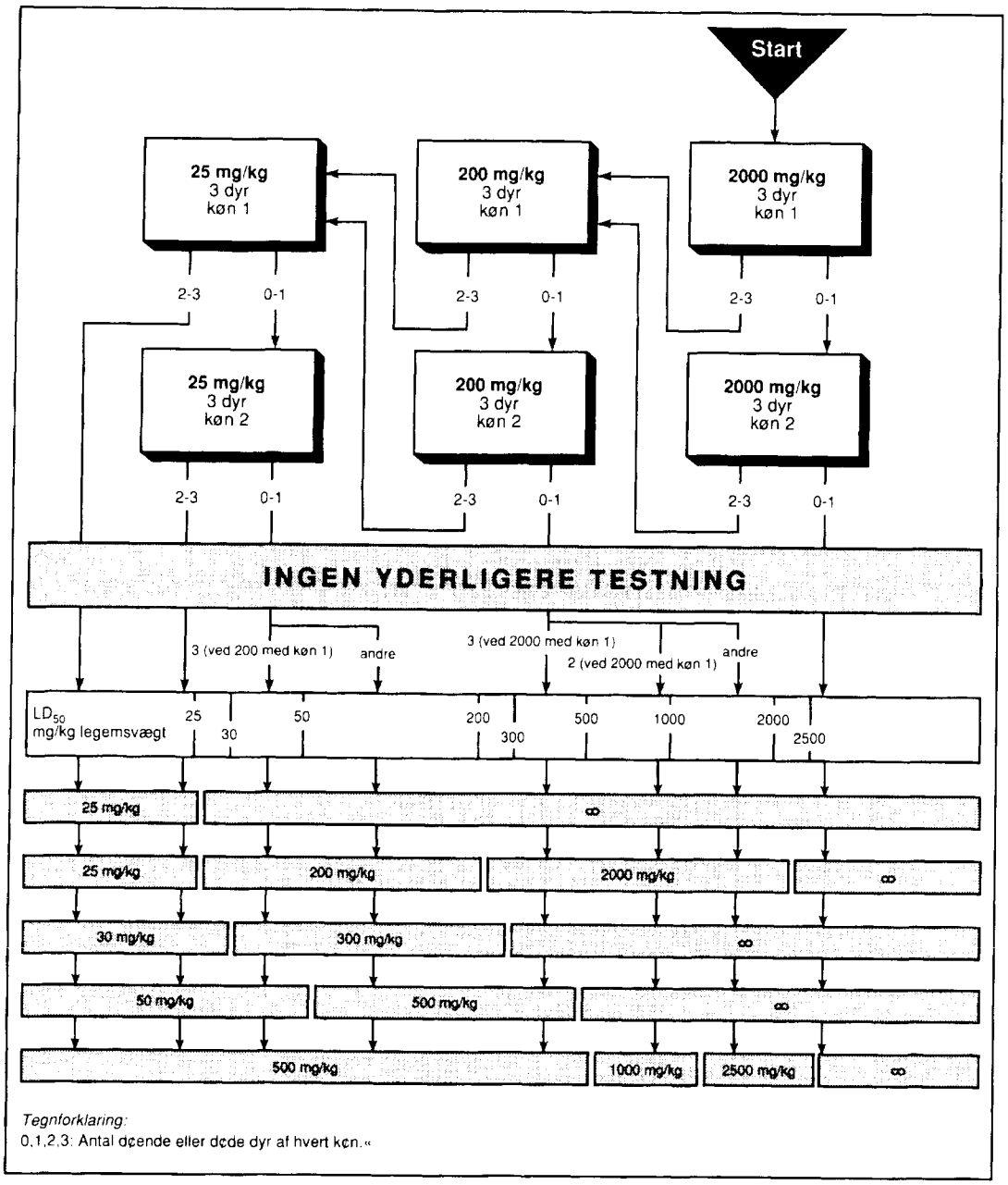


Tegnforklaring:

0,1,2,3: Antal døende eller døde dyr af hvert køn.

c) **Fortolkning af resultaterne baseret på mulighed 1-testning**

Udgangsdosis: 2 000 mg/kg legemsvægt



Tegnforklaring:

0,1,2,3: Antal dœende eller dœde dyr af hvert kœn.«

B.2. AKUT TOKSICITET (INHALATION)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Det er nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets partikelstørrelsesfordeling, damptryk, smeltepunkt, kogepunkt, flammepunkt og eventuelle eksplosive egenskaber.

Se også den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Flere grupper forsøgsdyr udsættes i en angivet periode for teststoffet i graduerede koncentrationer, idet der anvendes en bestemt koncentration til hver enkelt gruppe. Der foretages observationer af virkningerne, herunder død. Dyr, der dør under forsøget, obduceres. Ved slutningen af forsøget aflives og obduceres overlevende dyr.

Det kan være nødvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer på stærk smerte eller lidelse, aflives på human måde. Undersøgelse af stoffer på en måde, som på grund af deres ætsende eller lokalirriterende egenskaber vides at volde betydelig smerte og lidelse, er ikke påkrævet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, kønsmodne rotter fordeles randomiseret i det nødvendige antal grupper, inden forsøget sættes i gang. De behøver ikke udsættes for simuleret eksponering, medmindre dette indiceres af den type eksponeringsudstyr, der anvendes.

Det kan være nødvendigt at mikronisere faste teststoffer for at opnå en passende partikelstørrelse.

Om nødvendigt kan der tilsættes et egnet vehikel til teststoffet, således at der opnås en passende koncentration af teststoffet i luften. I så tilfælde skal der i forsøget indgå en kontrolgruppe, der udsættes for vehiklet. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere data benyttes.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Rotter er de foretrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes rotter af almindeligt anvendte stammer. For såvel han- som hunrotter gælder det, at vægten af de anvendte dyr ikke må variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt ved forsøgets begyndelse.

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst 10 gnavere (fem hunner og fem hanner) til hvert koncentrationsniveau af stoffet. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige.

Bemærk: Ved anvendelse af højere dyr end gnavere til undersøgelse af akut toksicitet skal det overvejes, om antallet af dyr kan nedsættes. Doserne skal fastlægges med omhu, og man skal bestræbe sig på ikke at benytte højere doser end moderat toksiske doser. I sådanne undersøgelser bør indgift af dødelige doser af teststoffet undgås.

1.6.2.3. *Eksponeringskoncentrationer*

Der anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre, og disse skal være valgt således, at der opnås en graduering af de toksiske virkninger og dødeligheden i testgrupperne. Der skal være tilstrækkelige data til, at der kan optegnes en dosis-virkningskurve og om muligt foretages en rimelig bestemmelse af LC_{50}.

»1.6.2.4. Grænsetest

Hvis en eksposition af fem han- og fem hundyr på 20 mg/l af et stof på gasform eller 5 mg/l af en aerosol eller et fint fordelt stof i fire timer, eller — hvis dette ikke kan lade sig gøre som følge af fysiske eller kemiske egenskaber (herunder eksplosive) ved teststoffet — den højest opnåelige koncentration ikke har teststofrelateret dødelig virkning inden for 14 dage, kan yderligere forsøg betragtes som overflødige.«.

1.6.2.5. *Eksponeringstid*

Eksponeringsperioden er fire timer.

1.6.2.6. *Udstyr*

Dyrene testes med inhalationsudstyr, der er udformet således, at der kan opretholdes en dynamisk luftcirkulation med et luftskifte på mindst 12 gange pr. time samtidig med et tilstrækkeligt iltindhold og jævn fordeling af eksponeringsluften. Benyttes der eksponeringskammer, skal det være således indrettet, at forsøgsdyrene sammenklumpes mindst muligt og eksponeres mest muligt for teststoffet ved inhalation. Den generelle regel for sikkerhed for stabil atmosfære er, at dyrenes totale »volumen« ikke må overstige 5 % af eksponeringskammerets volumen. Eksponeringen kan foregå gennem mund-næse, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen; ved anvendelse af de to første muligheder opnår man, at optagelsen af teststoffet ad andre veje minimeres.

1.6.2.7. *Observationsperiode*

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk, men bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, hvornår disse indtræder, og restitutionsperiodens længde; den kan således forlænges, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, samt dødstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtræffer sene dødsfald.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Kort før eksponeringen vejes dyrene, hvorefter de udsættes for testkoncentrationen i det pågældende eksponeringsudstyr i fire timer, efter at der er opnået ligevægtskoncentration i kammeret. Ligevægten skal opnås hurtigt. Temperaturen holdes under forsøget på 22 °C ± 3 °C. Under ideelle forhold skal den relative luftfugtighed holdes på mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfælde (f.eks. ved test af visse aerosoler) kan det være praktisk uigennemførligt. Udsivning af teststof til omgivelserne kan forhindres ved, at der i kammeret holdes et svagt undertryk ($\leqslant$ 5 mm vandsøjle). Der gives hverken foder eller vand under eksponeringen. Der anvendes passende systemer til generering og kontrol af testatmosfæren. Systemet skal sikre stabile eksponeringsforhold så hurtigt som muligt. Kammeret skal være konstrueret og kunne betjenes på en sådan måde, at testatmosfæren hele tiden er ensartet fordelt i kammeret.

Der foretages målinger eller kontrol af:

(a) lufthastighed (kontinuerligt)

(b) den faktiske koncentration af teststoffet målt i opholdsarealet mindst tre gange under eksponeringen (for nogle atmosfærers vedkommende, f.eks. aerosoler med høje koncentrationer, kan hyppigere kontrol være påkrævet). Koncentrationen må under eksponeringsperioden ikke variere mere end ± 15 % fra den gennemsnitlige koncentration. Det kan dog være umuligt at opnå en sådan grad af kontrol med visse aerosoler, og i så tilfælde kan større udsving accepteres. For aerosoler skal partikelstørrelsen analyseres så ofte, som det er nødvendigt (mindst én gang pr. forsøgsgruppe)

(c) temperatur og luftfugtighed, om muligt kontinuerligt.

Under og efter eksponering foretages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i løbet af den første dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst én gang hver arbejdsdag. Herudover bør dyrene dagligt observeres, så det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen, d.v.s. at dyr, der findes døde, obduceres eller nedkøles, og at svage eller døende dyr isoleres eller aflives.

Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinde, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønsteret. Der bør navnlig foretages en omhyggelig observation af respiration, rystelser, kramper, spytflåd, diarré, apati, søvn og bevidstløshed. Dødstidspunktet noteres med størst mulig nøjagtighed. Forsøgsdyrenes individuelle vægt bestemmes ugentligt og på dødstidspunktet.

De dyr, der dør under forsøget, og de, der overlever til forsøgets afslutning, obduceres med særlig opmærksomhed rettet mod eventuelle ændringer i de øvre og nedre luftveje. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, dødstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre symptomer på toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsfund. Vægtændringer beregnes og registreres for alle dyr, der lever mere end en dag efter eksponeringen. Aflivning af dyr på human måde på grund af lidelse og smerte fremkaldt af teststoffet registreres som teststofrelaterede dødsfald. LC_{50} bestemmes efter en anerkendt metode. Evaluering af data bør omfatte sammenhæng, hvis en sådan findes, mellem dyrenes eksponering for teststoffet og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfærdsmæssige og kliniske symptomer, makroskopisk patologiske forandringer, ændringer i legemsvægt, dødelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder o.s.v.

— forsøgsbetingelser:

beskrivelse af eksponeringsudstyret, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af aerosoler, metode til konditionering af luften og den måde, hvorpå dyrene holdes i et eksponeringskammer, når et sådant benyttes. Apparatur til måling af temperatur, fugtighed og aerosolers koncentration og partikelstørrelsesfordeling skal beskrives

Eksponeringsdata:

disse skal opstilles i tabelform med angivelse af middelværdier og et mål for variationen (standardafvigelser) og i videst muligt omfang omfatte:

(a) lufthastigheden gennem inhalationsudstyret

(b) luftens temperatur og fugtighed

(c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsudstyret, divideret med luftvolumen)

(d) type vehikel, hvor et sådant er anvendt

(e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget

(f) massemedianen af den aerodynamiske diameter (MMAD) og den geometriske standardafvigelse (GSD)

(g) periode til ligevægtsindstilling

(h) eksponeringsperiode

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og eksponeringsniveau (d.v.s. antal dyr eksponeret; antal dyr, der er døde eller aflivet under forsøget; antal dyr, der har vist symptomer på toksicitet)

— dødstidspunktet under eller efter eksponering; begrundelse og kriterier for human aflivning af dyr

— alle observationer

— LC_{50} for hvert køn bestemt ved afslutningen af observationsperioden (med angivelse af beregningsmetode)

— 95 % konfidensinterval for LC_{50} (hvor det er muligt)

— dosis/dødelighedskurve og hældning (hvor beregningsmetoden muliggør det)

— obduktionsfund

— eventuelle histopatologiske fund

— diskussion af resultaterne (med særlig opmærksomhed på, hvordan human aflivning af dyr under forsøget kan have indvirket på den beregnede LC_{50})

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

B.3. AKUT TOKSICITET (DERMAL)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet påføres huden på flere grupper af forsøgsdyr i graduerede doser, idet der anvendes en bestemt dosis til hver enkelt gruppe. Der foretages observationer af virkningerne, herunder død. Dyr, der dør under forsøget, obduceres. Ved slutningen af forsøget aflives og obduceres overlevende dyr.

Det kan være nødvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer på stærk smerte eller lidelse, aflives på human måde. Undersøgelse af stoffer på en måde, som på grund af deres ætsende eller lokalirriterende egenskaber vides at volde betydelig smerte og lidelse, er ikke påkrævet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgsgrupper, inden forsøget sættes i gang. Ca. 24 timer før forsøget påbegyndes, klippes eller barberes dyrene på ryggen. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden, da det kan ændre dens permeabilitet. Mindst 10 % af legemets overflade skal gøres klar til påføring af teststoffet. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, så der sikres god kontakt med huden. Hvis der anvendes et vehikel, bør man tage hensyn til, om vehiklet har indflydelse på hudens permeabilitet for teststoffet. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer. For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at vægten af de anvendte dyr ikke må variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt ved forsøgets begyndelse.

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst 5 dyr (af samme køn) til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Foreligger der oplysninger om, at et bestemt køn er væsentligt mere følsomt, benyttes der dyr af dette køn.

Bemærk: Ved anvendelse af højere dyr end gnavere til undersøgelse af akut toksicitet skal det overvejes, om antallet af dyr kan nedsættes. Doserne skal fastlægges med omhu, og man skal bestræbe sig på ikke at benytte højere doser end moderat toksiske doser. I sådanne undersøgelser bør indgift af dødelige doser af teststoffet undgås.

1.6.2.3. *Dosisniveauer*

Der anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre, og disse skal være valgt således, at der opnås en graduering af de toksiske virkninger og dødeligheden i testgrupperne. Der bør ved valg af dosis tages hensyn til eventuelle hudirriterende eller ætsende virkninger. Der skal være tilstrækkelige data til, at der kan optegnes en dosis-virkningskurve og om muligt foretages en rimelig bestemmelse af LD_{50}.

1.6.2.4. *Grænsetest*

Der kan med en gruppe på 5 dyr af hvert køn udføres en grænsetest med en dosis på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt efter den ovenfor beskrevne procedure. Optræder der teststofrelaterede dødsfald, kan gennemførelse af en fuldstændig undersøgelse komme i betragtning.

1.6.2.5. *Observationsperiode*

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk, men bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, hvornår disse indtræder, og af restitutionsperiodens længde; den kan således forlænges, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, samt dødstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtræffer sene dødsfald.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene holdes i hver sit bur. Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel i en eksponeringsperiode på 24 timer. Teststedet skal desuden tildækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert på plads, så at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstændig immobilisering ikke anbefales.

Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.

Der foretages systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i løbet af den første dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst én gang hver arbejdsdag. Herudover bør dyrene dagligt observeres, så det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen, d.v.s. at dyr, der findes døde, obduceres eller nedkøles, og at svage eller døende dyr isoleres eller aflives.

Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i pels, behandlet hud, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet samt adfærdsmønsteret. Der bør foretages omhyggelig observation af rystelser, kramper, spytflåd, diarré, apati, søvn og bevidstløshed. Dødstidspunktet skal noteres så præcist som muligt. De dyr, der dør under forsøget, og de, der overlever til forsøgets afslutning, obduceres. Alle makroskopisk patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

Vurdering af toksiciteten hos det modsatte køn

Efter afslutning af undersøgelsen med det ene køn testes en gruppe på 5 dyr af det modsatte køn, så det konstateres, om dyr af dette køn er væsentligt mere følsomme over for teststoffet. I enkelte tilfælde kan anvendelse af færre dyr være velbegrundet. Foreligger der tilstrækkelige oplysninger om, at dyr af det køn, der er testet, er væsentligt mere følsomme, er test med dyr af det modsatte køn ikke påkrævet.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, dødstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre symptomer på toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsresultater. Dyrenes individuelle vægt bestemmes og registreres, kort før teststoffet påføres, derefter ugentligt og endelig på dødstidspunktet. Vægtændringer beregnes og registreres for alle dyr, der lever mere end én dag efter påføringen af teststoffet. Aflivning af dyr på human måde på grund af lidelse og smerte fremkaldt af teststoffet registreres som teststofrelaterede dødsfald. LD_{50} bestemmes efter en anerkendt metode.

Evaluering af data bør omfatte sammenhæng, hvis en sådan findes, mellem dyrenes eksponering for teststof og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfærdsmæssige og kliniske symptomer, makroskopisk patologiske forandringer, ændringer i legemsvægt, dødelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder o.s.v.

— forsøgsbetingelser (herunder, hvordan huden er renset, og forbindingstypen: med eller uden okklusion)

— dosisniveauer (med angivelse af typen af vehikel, hvor et sådant er anvendt, samt koncentration)

— forsøgsdyrenes køn

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og dosis (d.v.s. antal dyr, der er døde eller aflivet under forsøget; antal dyr, der har vist symptomer på toksicitet; antal eksponerede dyr)

— dødstidspunktet efter eksponeringen, begrundelse og kriterier for human aflivning af dyr

— alle observationer

— LD_{50} for det køn, der har været genstand for en fuldstændig undersøgelse, bestemt efter 14. dag med angivelse af beregningsmetode

— 95 % konfidensinterval for LD_{50} (hvor det er muligt)

— dosis/dødelighedskurve og hældning, hvor beregningsmetoden muliggør det

— obduktionsfund

— eventuelle histopatologiske fund

— resultater af forsøg med det modsatte køn

— diskussion af resultaterne (med særlig opmærksomhed på, hvordan human aflivning af dyr under forsøget kan have indvirket på den beregnede LD_{50})

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

B.4. AKUT TOKSICITET (HUDIRRITATION)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Indledende betragtninger

Alle foreliggende oplysninger om teststoffet skal tages under omhyggelig overvejelse, så der foretages færrest mulige forsøg med stoffer under betingelser, der må formodes at give voldsom reaktion. Følgende oplysninger kan være til nytte, når det skal afgøres, om der skal udføres en fuldstændig undersøgelse, en enkeltdyrsundersøgelse eller slet ingen undersøgelse.

i) Fysisk-kemiske egenskaber og kemisk reaktivitet. Stærkt sure og stærkt basiske stoffer (f.eks. pH under eller lig med 2 eller over eller lig med 11,5) behøver muligvis ikke at blive testet for primær hudirritation, hvis der må forventes ætsende egenskaber. Der skal desuden tages hensyn til stoffets syre-/base-kapacitet.

ii) Foreligger der resultater af godt validerede *in vitro*-test, der tydeligt peger på alvorlige virkninger, er en fuldstændig undersøgelse ikke altid påkrævet.

iii) Resultater af undersøgelser af akut toksicitet. Er der foretaget undersøgelse af akut toksicitet ved optagelse gennem huden med en dosis af stoffet på grænsetestniveau (2 000 mg/kg legemsvægt) og ikke iagttaget nogen hudirritation, kan yderligere test for hudirritation være overflødig. Test af stoffer, der er vist at have et højt niveau af giftighed ved optagelse gennem huden, er ligeledes unødvendig.

Teststoffet påføres huden i en enkelt dosis på en række forsøgsdyr, der hver især fungerer som sin egen kontrol. Efter et fastlagt tidsrum vurderes og klassificeres graden af irritation, som desuden beskrives detaljeret med henblik på en fuldstændig vurdering af virkningerne. Observationerne bør strække sig over et så langt tidsrum, at der bliver mulighed for en fuldstændig vurdering af, om de iagttagne virkninger er reversible.

Det kan være nødvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer på stærk smerte eller lidelse, aflives på human måde.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. Forberedelser

Ca. 24 timer før forsøget påbegyndes, klippes eller barberes dyrene på ryggen.

Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden. Der benyttes kun dyr med sund og intakt hud.

Nogle kaninstammer har pletter med tæt pels, som er mere fremtrædende på visse tidspunkter af året. Der påføres ikke teststof på disse områder med tæt hårvækst.

Ved test af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, så der sikres god kontakt med huden. Hvis der anvendes et vehikel, bør man tage hensyn til, om vehiklet har indflydelse på teststoffets hudirriterende virkning. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Albinokaniner er det foretrukne forsøgsdyr, selv om mange andre pattedyrarter også kan anvendes.

1.6.2.2. *Antal dyr*

Hvis stoffet på grundlag af *in vitro*-screeningsforsøg eller af andre årsager mistænkes for at fremkalde nekrose (d.v.s. at være ætsende), kan en enkeltdyrsundersøgelse komme på tale. Hvis en sådan undersøgelse ikke tyder på ætsning, suppleres den med en undersøgelse med yderligere mindst to dyr.

Til en fuldstændig undersøgelse anvendes der mindst tre sunde kønsmodne dyr. Det er ikke nødvendigt at anvende en særskilt kontrolgruppe af ubehandlede dyr. Det kan være nødvendigt at anvende flere dyr for at afklare tvetydige reaktioner.

1.6.2.3. *Dosisniveau*

Medmindre der foreligger kontraindikationer, påføres testarealet 0,5 ml flydende eller 0,5 g fast eller halvflydende teststof. Nærliggende, ubehandlede hudområder på hvert enkelt dyr fungerer som kontrol.

1.6.2.4. *Observationsperiode*

Observationsperiodens varighed bør ikke fastsættes rigoristisk. Den skal være tilstrækkelig lang til at vurdere den observerede virkning og en eventuel tilbagevenden til normaltilstanden, men behøver ikke i almindelighed overskride 14 dage efter påføringen.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene holdes i hver sit bur. Teststoffet påføres et lille hudområde (ca. 6 cm^2) og dækkes med et stykke gaze, som holdes på plads med en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Hvis der anvendes flydende eller pastaagtige teststoffer, kan det være nødvendigt at påføre gazestoffet teststoffet og så placere gazestykket på huden. Gazestykket skal holdes i løs kontakt med huden v.h.a. en passende occlusiv eller semi-occlusiv forbinding i hele eksponeringsperioden. Man skal sikre sig, at dyrene ikke kan komme til at løsne gazestykket og herved indtage eller indånde teststoffet.

Ved eksponeringsperiodens afslutning skal rester af teststoffet fjernes hvor dette er muligt, idet der bruges vand eller et passende opløsningsmiddel, idet men skal undgå at påvirke en eventuel hudreaktion.

Eksponeringstiden er normalt fire timer.

Hvis det mistænkes at stoffet kan medføre nekroser (dvs. virke ætsende), skal eksponeringstiden nedsættes (fx til 3 min. til 1 time). Ved en sådan undersøgelse kan man starte med at benytte et enkelt dyr. Hvis den dermale toksicitet af teststoffet ikke udelukker det, kan man samtidig bruge tre forbindinger på dette forsøgsdyr. Den første forbinding fjernes efter tre minutter. Hvis der ikke observeres alvorlige hudreaktioner, fjernes den anden forbinding efter en time. Hvis observationerne på dette trin antyder at en fire timers eksponering er nødvendig og kan udføres humant, fjernes den tredje forbinding efter fire timer og reaktionerne aflæses. I dette tilfælde

(dvs når fire timers eksponering er mulig), kompletteres testen idet der bruges mindst to dyr yderligere, bortset fra de tilfælde hvor dette ikke skønnes humant (fx hvis der observeres nekroser efter fire timers eksponering).

Hvis en alvorlig hudreaktion observeres enten efter tre minutter eller en time, afsluttes testen øjeblikkeligt.

Længere eksponering kan være indikeret under særlige forhold, fx under hensyntagen til brugen af stoffet og menneskets eksponering.

1.6.3.1. *Observering og gradering*

Dyrene skal observeres for tegn på erythem og ødem, og reaktionen skal aflæses efter 60 minutter, 24 timer, 48 timer og 72 timer efter at forbindingen er fjernet. Hudreaktionen aflæses og resultatet noteres i overensstemmelse med systemet i tabel 1. Yderligere observationer kan være nødvendige hvis tilbagevenden til normal tilstanden ikke helt har fundet sted inden for 72 timer. Udover observation af irritation, skal enhver alvorlig effekt såsom ætsning (irreversibel ødelæggelse af hudvæv) og andre gift-effekter beskrives fuldstændigt.

Teknikker så som histopatologisk undersøgelse eller måling af hudfold-tykkelse kan evt. bruges til at opklare tvivlsomme reaktioner som skjules af hudfarvning forårsaget af teststoffet.

2. DATA

Data skal opgøres i tabelform, idet irritationsgraderingen for erythem og ødem vises for hvert enkelt dyr i gennem hele observationsperioden. Ved enhver observeret alvorlig skade angives graden og naturen af irritation, reversibiliteten eller ætsvirkningen samt enhver anden toksisk effekt.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder o.s.v.

— forsøgsbetingelser (herunder det kemiske stofs relevante fysisk-kemiske egenskaber, den anvendte teknik ved forberedelse og rensning af huden samt forbindingstypen: okklusiv eller semi-okklusiv)

— tabelopstilling over hvert enkelt dyrs irritationsreaktion i hver enkelt observationsperiode (f.eks. 1, 24, 48, 72 o.s.v. timer efter fjernelse af forbindingen)

— beskrivelse af alle alvorlige læsioner, inklusive ætsning

— beskrivelse af arten og graden af den observerede irritation og eventuelle histopatologiske fund

— beskrivelse af eventuelle toksiske virkninger udover hudirritation

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

Bilag

TABEL: KLASSIFICERING AF HUDREAKTIONER

Erytem og skorpedannelse

	Værdi
Intet erytem	0
Let erytem (knapt diagnosticerbart)	1
Veldefineret erytem	2
Moderat til svært erytem	3
Svært erytem (rødbedefarvet) eller skorpedannelse (dybere-gående beskadigelse), der forhindrer vurdering af erytem	4

Ødemer

Intet ødem	0
Let ødem (knapt diagnosticerbart)	1
Ødem (veldefineret afgrænset område med konstaterbar hævelse)	2
Moderat ødem (afgrænset, ca. 1 mm hævelse)	3
Svært ødem (mere end 1 mm hævelse og udstrækning ud over eksponeringsområdet)	4

B.5. AKUT TOKSICITET (ØJENIRRITATION)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Indledende betragtninger

Alle foreliggende oplysninger om teststoffet skal tages under omhyggelig overvejelse, så der foretages færrest mulige forsøg med stoffer under betingelser, der må formodes at give voldsom reaktion. Følgende oplysninger kan være til nytte i denne henseende.

i) Fysisk-kemiske egenskaber og kemisk reaktivitet. Stærkt sure og stærkt basiske stoffer, som f.eks. forventes at føre til et pH i øjet på under eller lig med 2 eller over eller lig med 11,5, behøver muligvis ikke at blive testet, hvis der må forventes svære læsioner. Der skal desuden tages hensyn til stoffets syre-/base-kapacitet.

ii) Resultater af godt validerede alternative undersøgelser; materialer, der er vist at have potentielle ætsende eller stærkt lokalirriterende egenskaber, undersøges ikke yderligere for øjenirritation, da det må antages, at sådanne stoffer vil påvirke øjet voldsomt ved den foreliggende forsøgsmetode.

iii) Resultater af undersøgelser af hudirritation. Materialer, der i en undersøgelse for hudirritation er vist at have tydelige ætsende eller stærkt lokalirriterende egenskaber, undersøges ikke yderligere for øjenirritation, da det må antages, at sådanne stoffer vil påvirke øjet voldsomt.

Hele teststofdosis påføres i det ene øje af et antal forsøgsdyr. Det ubehandlede øje benyttes som kontrol. Graden af irritation vurderes og klassificeres med bestemte intervaller og beskrives udførligt med henblik på en fuldstændig vurdering af virkningerne. Observationerne bør strække sig over så langt et tidsrum, at der bliver mulighed for en fuldstændig vurdering af, om de iagttagne virkninger er reversible eller irreversible.

Det kan være nødvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer på stærk smerte eller lidelse, aflives på human måde.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Inden for de sidste 24 timer før forsøget begyndes, undersøges øjnene på de dyr, der foreløbig er udtaget til forsøget. Dyr, som lider af øjenirritation, øjendefekter, eller som tidligere har haft hornhindebeskadigelser, anvendes ikke.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Det anbefales at anvende sunde, kønsmodne albinokaniner, selv om mange andre forsøgsdyr har været anvendt.

1.6.2.2. *Antal dyr*

Forventes der tydelige virkninger, kan et enkeltdyrsforsøg komme i betragtning. Hvis resultaterne af dette forsøg med én kanin viser, at stoffet er stærkt øjenirriterende (reversibel virkning) eller ætsende (irreversibel virkning) ved den beskrevne fremgangsmåde, er det ikke altid nødvendigt at fortsætte undersøgelsen af øjenirritation med flere dyr. I enkelte tilfælde kan det være hensigtsmæssigt at undersøge specifikke aspekter ved forsøg med flere dyr.

I alle andre tilfælde end enkeltdyrsforsøget anvendes der mindst 3 dyr. Det kan være nødvendigt at anvende flere dyr for at afklare tvetydige reaktioner.

1.6.2.3. *Dosisniveauer*

Ved undersøgelse af væsker anvendes der 0,1 ml. Ved undersøgelse af faste stoffer, pastaer og fintfordelte faste stoffer anvendes et volumen på 0,1 ml eller en mængde på ca. 0,1 g (vægten registreres under alle omstændigheder). Faste og granulerede teststoffer knuses til fint støv. Partiklernes volumen måles efter let sammenrystning f.eks. frembragt ved små slag på målebeholderen.

Foreligger stoffet i flaske med forstøver eller i spraydåse, opsamles der 0,1 ml af den udsprøjtede væske, som inddryppes i øjet på samme måde som beskrevet for væsker.

1.6.2.4. *Observationsperiode*

Observationsperiodens varighed bør ikke fastsættes rigoristisk. Den bør være tilstrækkelig lang til at give mulighed for en vurdering af, om observerede virkninger er reversible eller irreversible, men behøver normalt ikke overskride 21 dage regnet fra inddrypningen.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene skal holdes i hver sit bur. Teststoffet inddryppes hos hvert enkelt dyr i det ene øjes nederste øjenlåg ved, at dette forsigtigt trækkes lidt ud fra øjeæblet. Derefter holdes øjenlågene forsigtigt sammen i ca. et sekund, så at ikke noget af stoffet løber ud. Det ubehandlede øje fungerer som kontrol.

Hvis det menes, at teststoffet kan forårsage urimelige smerter, kan der anvendes lokalbedøvelse før inddrypning af teststoffet. Bedøvelsesmidlets type, koncentration og anvendelsestidspunkt vælges med omhu, så anvendelsen ikke medfører signifikant forskellig reaktion på teststoffet. Kontroløjet bedøves på samme måde.

I 24 timer efter inddrypning af teststoffet må der ikke foretages skylning af forsøgsdyrenes øjne. Efter 24 timers forløb kan der, hvis det skønnes rimeligt, foretages skylning.

For nogle af de stoffer, der i denne test har vist sig at forårsage øjenirritation, kan der være indikationer for yderligere forsøg, hvor kaninernes øjne skylles ud kort efter inddrypning af stoffet. I så tilfælde anbefales det at anvende tre kaniner. Et halvt minut efter instillationen skylles kaninernes øjne i et halvt minut med en væskemængde og et væsketryk, som ikke beskadiger øjet.

1.6.3.1. *Observation og klassificering*

Øjnene undersøges efter 1, 24, 48 og 72 timers forløb. Hvis der ikke er tegn på øjenlæsion efter 72 timer, kan undersøgelsen afsluttes.

Såfremt der forekommer vedvarende beskadigelse af hornhinden eller anden øjenirritation, kan det være nødvendigt at forlænge observationsperioden, så det kan bestemmes, hvordan læsionerne udvikler sig, og om de er reversible eller irreversible. Samtidig med observation af hornhinde, iris og bindehinder registreres og rapporteres eventuelle andre læsioner. Øjets reaktionsgrad (tabellen) skal registreres ved hver enkelt undersøgelse. (Inddeling af øjets reaktioner i grader kan gøres til genstand for forskellige fortolkninger. Til hjælp for forsøgslaboratorier og personale, der foretager og fortolker observationer, kan der anvendes en illustreret vejledning om øjenirritationer.)

Undersøgelse af øjenreaktionerne kan lettes ved anvendelse af binokulær lup, håndspaltelampe, ophthalmoskop eller andre egnede instrumenter. Efter de første 24 timers observationer kan en eller flere kaniners øjne undersøges yderligere ved hjælp af fluorescein.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hvert enkelt dyr angiver klassificering af øjenirritation på de enkelte observationstidspunkter. En beskrivelse af arten og graden af irritation og tilstedeværelse af alvorlige læsioner og enhver observeret virkning ud over virkningen på selve øjet skal indgå i rapporten.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyredata (art/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder o.s.v.)

— forsøgsbetingelser (herunder teststoffets relevante fysisk-kemiske egenskaber)

— tabelopstilling over hvert enkelt dyrs irritations/ætsningsreaktion på hvert enkelt observationstidspunkt (f.eks. efter 1, 24, 48 og 72 timer)

— beskrivelse af alle alvorlige læsioner

— beskrivelse af arten og graden af observeret irritation og ætsning, herunder det berørte område af hornhinden, og tilbagevenden til normal tilstand

— beskrivelse af den metode, der er anvendt til klassificering af irritation efter 1, 24, 48 og 72 timers forløb (f.eks. håndspaltelampe, ophthalmoskop, fluorescein)

— beskrivelse af eventuelle registrerede lokale virkninger uden for selve øjet

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

Bilag

TABEL: KLASSIFICERING AF ØJENLÆSIONER

Hornhinden (Cornea)

Opacitet: graden af uklarhed (vurdering baseres på det område, der udviser den største uklarhed).

Ingen sårdannelse eller opacitet 0

Spredte eller diffuse områder med opacitet (ud over let tåge i stedet for normal glans), iris klar og detaljeret synlig 1

Umiddelbart skelneligt gennemskinneligt område, let sløring af detaljerne i iris 2

Perlemorsfarvet område, detaljerne i iris ikke synlige, pupilstørrelsen knapt synlig 3

Fuldstændig opacitet, iris ikke synlig gennem opacitet 4

Iris

Normal 0

Markant dybere rugae, kongestion, opsvulmning, moderat hyperæmi omkring hornhinden eller injicerede conjunctiva eller flere af disse symptomer, iris stadig lysfølsom (træg reaktion er positiv) 1

Ingen lysfølsomhed, hæmoragi, makroskopisk synlig beskadigelse (et eller flere af disse symptomer) 2

Bindehinder (Conjunctiva)

Rødme (vurdering baseres på den alvorligste klassificering af henholdsvis øjenlågets og øjeæblets bindehinde sammenlignet med kontroløjet).

Normale blodkar 0

Nogle blodkar tydeligt hyperæmiske (injicerede) 1

Spredt højrød farvning, de enkelte kar ikke klartskelnelige 2

Spredt mørkerød farvning 3

Chemosis: øjenlåg og/eller blinkhinde

Ingen opsvulmning 0

Unormal opsvulmning (omfattende blinkhinden) 1

Tydelig opsvulmning med partiel udkrængning af øjenlågene 2

Opsvulmning med halvt lukkede øjenlåg 3

Opsvulmning med øjenlågene mere end halvt lukkede 4

»B.6 HUDSENSIBILISERING

1. METODE

1.1. Indledning

Bemærkninger:

I et system for klassifikation af den toksicitet, der er relevant for folkesundheden, er det af stor betydning at have følsomme test, som kan afsløre stoffer, der kan virke hudsensibiliserende på mennesker.

Der findes ikke én enkelt testmetode, hvorved man med sikkerhed kan identificere alle stoffer, som kan virke hudsensibiliserende på mennesker, og som kan anvendes til alle stoffer.

Der skal ved valg af test tages hensyn til en række faktorer såsom stoffets fysiske egenskaber, herunder dets evne til at trænge gennem huden.

Der er udviklet to testtyper med anvendelse af marsvin: adjuvanstypen, hvor en allergisk tilstand forstærkes, når teststoffet opløses eller opslæmmes i Freund's komplette adjuvans (FCA), og typen uden adjuvans.

Test af adjuvanstypen vil normalt forudsige et stofs sandsynlige hudsensibiliserende virkning hos mennesker mere præcist end de metoder, hvor der ikke benyttes Freund's komplette adjuvans, og bliver derfor foretrukket.

Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT) er en meget anvendt test af adjuvanstypen. Skønt en række andre metoder kan benyttes til at undersøge et stofs potentielle hudsensibiliserende virkning, er GPMT den foretrukne metode af adjuvanstypen.

Test uden adjuvans (hvor Buehler-testen er den foretrukne) bliver for mange kemiske stofgrupper anset for at være mindre følsom.

Der kan i visse tilfælde, være gode grunde til at vælge Buehler-testen med lokal påføring i stedet for den intradermale injektion, der benyttes i maksimeringstesten på marsvin. Der skal gives en videnskabelig begrundelse for anvendelse af Buehlertesten.

I denne metode beskrives maksimeringstesten på marsvin (GPMT) og Buehlertesten. Der kan anvendes andre metoder, forudsat at de er tilstrækkeligt validerede, og at valget er videnskabeligt begrundet.

Hvis testresultatet i en af de anerkendte screeningstest er positivt, er det tilladt at betegne stoffet som potentielt sensibiliserende og det er måske ikke nødvendigt at udføre yderligere marsvineforsøg. Hvis stoffet er negativt i en af de anerkendte screeningsmetoder skal der udføres en marsvinetest, hvor der bruges de fremgangsmåder, der er beskrevet i denne testmetode.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Hudsensibilisering: (allergiske kontaktdermatitis) er en immunologisk hudreaktion på et stof. Hos mennesker kan reaktionerne være karakteriseret ved kløen, erytem, ødem, papler, vesikler, blærer eller en kombination heraf. Andre arter kan have andre reaktioner f.eks. kun erytem og ødem.

Induktionseksponering: eksperimentel eksponering af et individ for et teststof med henblik på fremkaldelse af hypersensibel tilstand.

Induktionsperiode: tidsrum på mindst en uge efter en induktionseksponering, under hvilken en hypersensibel tilstand kan være opstået.

Provokationseksponering: eksperimentel eksponering — efter en induktionsperiode — af et tidligere behandlet individ for et teststof til konstatering af, om individet reagerer hypersensibelt.

1.3. **Referencestoffer**

Den anvendte forsøgsmetodes følsomhed og pålidelighed vurderes hver sjette måned med anvendelse af stoffer, der vides at have mildt til moderat hudsensibiliserende egenskaber.

I en velgennemført test bør der for mildt/moderat sensibiliserende stoffer ventes en reaktion på mindst 30 % i en adjuvanstest og mindst 15 % i en test uden adjuvans.

Følgende stoffer foretrækkes:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-navn	Fælles navn
101-86-0	202-983-3	α-hexylkanelaldehyd	α-hexylkanelaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzothiazol-2-thiol (mercapto-benzothiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzocain	norcain

Under visse omstændigheder vil andre kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

1.4. **Testmetodens princip**

Forsøgsdyrene udsættes først for teststoffet med intradermale injektioner og/eller epidermal applikation (induktionseksponering). Efter en hvileperiode på 10-14 dage (induktionsperiode), hvor der kan udvikle sig immunrespons, udsættes dyrene for en provokationsdosis. Omfanget og graden af hudens reaktion på provokationseksponeringen i forsøgsdyrene sammenlignes med resultater fra kontroldyr, der har fået placebo-behandling i induktionsperioden og dernæst er eksponeret for provokationsdosis.

1.5. **Beskrivelse af testmetoderne**

Hvis det anses for nødvendigt at fjerne teststoffet, bør dette gøres med vand eller et passende opløsningsmiddel, uden at den fremkaldte reaktion ændres eller overhuden beskadiges.

1.5.1. *Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT)*

1.5.1.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøges afslutning.

1.5.1.2. Forsøgsbetingelser

1.5.1.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.1.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst ti dyr og kontrolgruppen af mindst fem dyr. Hvis der anvendtes mindre end tyve forsøgsmarsvin og ti kontrolmarsvin og det ikke er muligt at konkludere, at teststoffet er sensibiliserende, anbefales det stærkt at teste stoffet i yderligere dyr, så der i alt er tale om mindst tyve forsøgsdyr og ti kontroldyr.

1.5.1.2.3. Dosisniveauer

Den koncentration af teststoffet, der anvendes ved hver induktionseksponering, må ikke forårsage systemiske gener og skal være den størst mulige, der forårsager mild til moderat hudirritation. Provokationskoncentrationen skal være den størst mulige, der ikke fremkalder hudirritation. Hvis nødvendigt kan, de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr. Det bør overvejes at bruge FCA-behandlede dyr til dette formål.

1.5.1.3. Fremgangsmåde

1.5.1.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis i skulderpartiet — hvorfra hårlaget er fjernet — således, at hvert injektionspar består af en injektion på hver side af midterlinien.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: teststoffet i et passende vehikel i den udvalgte koncentration.

Injektion 3: teststoffet i den valgte koncentration i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

I injektion 3 opløses vandopløselige stoffer i vandfasen før de blandes med FCA. Fedtopløselige eller uopløselige stoffer opslæmmes i FCA forud for blanding med den vandige fase. Teststoffets slutkoncentration skal være den samme som i injektion 2.

Injektion 1 og 2 placeres tæt på hinanden og nærmest ved hovedet, mens injektion 3 placeres i den bageste del af testområdet.

Dag 0 — kontrolgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis på samme måde som for forsøgsdyrene.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: det ufortyndede vehikel

Injektion 3: en 50 vægtprocent formulering af vehiklet i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Dag 5-7 — forsøgsgruppe og kontrolgruppe

Hvis stoffet ikke er hudirriterende, fremkaldes der, ca. 24 timer inden den lokale induktionsapplikation, en lokal irritation ved behandling af testområdet med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaseline, efter klipning og/eller barbering.

Dag 6-8 — forsøgsgruppe

Testområdet klippes. Et stykke filtrerpapir (2 × 4 cm) gennemvædes med teststoffet, der er blandet med et passende vehikel, og anbringes på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer. Valget af vehikel skal begrundes. Faste stoffer pulveriseres og inkorporeres i et passende vehikel. Væske kan eventuelt anvendes direkte.

Dag 6-8 — kontrolgruppe

Testområdet klippes. Vehikel alene anbringes på tilsvarende måde på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer.

1.5.1.3.2. Provokation

Dag 20-22 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrenes flanke for hår. På forsøgsdyrenes ene side anbringes en lap eller en kapsel med teststoffet, og, hvis det er relevant, kan der også anbringes en lap eller en kapsel med rent vehikel på den anden side. Lapperne holdes i kontakt med huden i 24 timer med en okkulsiv forbinding.

1.5.1.3.3. Observation og scoring: forsøgs- og kontrolgruppe

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, renses provokationsområdet og befries om nødvendigt for hår

— ca. 3 timer senere (ca. 48 timer efter påføring af provokationsdosis) observeres hudens reaktion, som registreres efter den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter denne observation foretages endnu en observation (72 timer), som registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendige at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. 1 uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnusson/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklæring af tvetydige reaktioner.

1.5.2. *Buehler-test*

1.5.2.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøges afslutning.

1.5.2.2. Forsøgsbetingelser

1.5.2.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.2.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst 20 dyr og kontrolgruppen af mindst ti dyr.

1.5.2.2.3. Dosisniveauer

Der vælges en så høj koncentration af teststoffet for hver induktionseksponering, at der fremkaldes en mild, men ikke overdreven irritation. Provokationskoncentrationen bør være den størst mulige, der ikke fremkalder irritation. Hvis nødvendigt, kan, de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr.

For vandopløselige teststoffer kan der som vehikel bruges vand eller en fortyndet, ikke-irriterende opløsning af et overfladeaktivt stof. For andre teststoffer foretrækkes 80 % ethanol/vand til induktionseksponering og acetone til provokationseksponering.

1.5.2.3. Fremgangsmåde

1.5.2.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Testlappesystemet skal være gennemvædet med teststoffet i et egnet vehikel (valg af vehikel skal begrundes; væsker kan eventuelt anvendes direkte). Testlappesystemet anbringes på testområdet og fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer.

Testlappesystemet skal være okklusivt. Et stykke gaze er passende: det kan være rundt eller firkantet, af en størrelse på ca. 4-6 cm^2. For at sikre okklusion foretrækkes det, at dyrenes bevægelsesfrihed begrænses med passende midler. Hvis der anvendes bandage, kan yderligere eksponering være nødvendig.

Dag 0 — kontrolgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Vehiklet alene anbringes på testområdet på tilsvarende måde som for forsøgsgruppen. Testlappesystemet fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer. Hvis det kan påvises, at der ikke er behov for en placebo-kontrolgruppe, kan en ikke forud testet kontrolgruppe (naive control group) bruges.

Dag 6-8 og 13-15 — forsøgs- og kontrolgruppen

På dag 6-8 og igen på dag 13-15 foretages samme påføring som på dag 0 på samme testområde (om nødvendigt befriet for hår).

1.5.2.3.2. Provokation

Dag 27-29 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrene for hår (klippes tæt) på den anden flanke. Bagest på flanken på forsøgs- og kontroldyrene anbringes en okklusiv lap eller kapsel med en passende mængde teststof i den højest mulige koncentration, der ikke fremkalder irritation.

Hvis det er relevant, anbringes desuden en okklusiv lap eller kapsel med vehikel alene forrest på flanken på såvel forsøgs- som kontroldyr. Lapper og kapsler fastholdes i kontakt med huden med en passende forbinding i seks timer.

1.5.2.3.3. Observation og scoring

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, befries provokationsområdet for hår

— ca. tre timer senere (ca. 30 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktion, og denne registreres i henhold til den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter observationen efter 30 timer (dvs. 54 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktioner igen og registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendigt at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. 1 uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnussen/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklaring af tvetydige reaktioner.

2. DATA (GPMT OG BUEHLER-TEST)

Data opstilles i tabelform, som angiver hudens reaktion ved hver enkelt observation af hver enkelt dyr.

3. RAPPORTERING (GPMT OG BUEHLER-TEST)

Hvis der udføres en screeningtest inden marsvinetesten, skal der sammen med de resultater, der er opnået med test- og referencestofferne, gives en beskrivelse af eller henvisning til testen (f.eks. Local Lymph Node Assay (LLNA); Mouse Ear Swelling Test (MEST)), herunder oplysninger om fremgangsmåde.

Forsøgsrapport (GPMT og Buehler-test)

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt marsvinestamme

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, laboratoriemiljø, foder osv.

— hvert enkelt dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Forsøgsbetingelser:

— metode til forberedelse af stedet for anbringelse af lap

— oplysninger om anvendte lapmaterialer og metode til anbringelse af lapper

— resultat af forundersøgelse med konklusioner om de induktions- og provokationskoncentrationer, der skal anvendes i testen

— oplysninger om teststoffets tilberedning, påføring og fjernelse

— begrundelse for valg af vehikel

— de vehikel- og teststofkoncentrationer, der er anvendt til induktions- og provokationseksponering, og den samlede mængde stof, der er anvendt til induktion og provokation.

Resultater:

— resumé af resultaterne af den seneste følsomheds- og pålidelighedskontrol (jf. 1.3), herunder oplysninger om anvendt stof, koncentration og vehikel

— oplysninger om observationerne af hvert enkelt dyr, herunder scoringssystem

— beskrivende redegørelse for de observerede virkningers art og styrke

— eventuelle histopatologiske fund.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. LITTERATURHENVISNINGER

Denne metode svarer til TG 406 fra OECD

TABEL:

Magnusson/Kligmans scoringsskala til vurdering af reaktionerne på provokationslappetest

0 = ingen synlig forandring

1 = afgrænset eller pletvis erytem

2 = moderat og sammenflydende erytem

3 = kraftigt erytem og hævelse.

»B.7 TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, ORAL)

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Testmetodens princip

Teststoffet indgives oralt dagligt i graduerede doser til grupper af forsøgsdyr, idet der gives en bestemt dosis til hver gruppe gennem en periode på 28 dage. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

Med denne metode lægges der større vægt på neurologiske effekter som et specifikt endepunkt; dyrene skal underkastes omhyggelige kliniske observationer med henblik på indhentning af flest mulige oplysninger. Metoden tager sigte på at identificere kemiske stoffer med neurotoksisk potentiale, som i givet fald bør undersøges nøjere. Herudover kan metoden vise, om der er tegn på immunologiske effekter og toksicitet for kønsorganerne.

1.4. Beskrivelse af testmetoden

1.4.1. *Forberedelser*

Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i kontrol- og forsøgsgrupper. Burene bør anbringes således, at mulige virkninger som følge af burenes placering minimeres. Dyrene mærkes individuelt og tilbringer mindst fem dage i deres bure forud for forsøgets påbegyndelse, så de tilvænnes laboratoriebetingelserne.

Teststoffet indgives med mavesonde, i foderet eller i drikkevandet, afhængigt af formålet med forsøget og stoffets fysisk-kemiske egenskaber. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et egnet vehikel. Det anbefales, at der så vidt muligt anvendes en vandig opløsning/opslæmning og, hvis dette ikke er muligt, en opløsning/emulsion i olie (f.eks. majsolie) eller eventuelt en opløsning i andre vehikler. Ikke-vandige vehiklers toksiske egenskaber skal være kendt. Teststoffets stabilitet i vehiklet bør bestemmes.

1.4.2. *Forsøgsbetingelser*

1.4.2.1. Forsøgsdyr

Rotten er den foretrukne gnaveart, skønt andre gnavearter kan anvendes. Der benyttes unge, sunde rotter af almindeligt anvendte laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Dosering bør påbegyndes tidligst muligt efter fravænning og under alle omstændigheder, inden rotterne er 9 uger gamle.

Ved forsøgets begyndelse skal vægten af de anvendte dyr variere mindst muligt og ikke mere end ± 20 % af gennemsnitsvægten af hvert køn.

Hvis en undersøgelse med gentagen oral dosis gennemføres som en forundersøgelse forud for en langtidsundersøgelse, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og herkomst i begge undersøgelser.

1.4.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst ti dyr (fem hunner og fem hanner) ved hvert dosisniveau. Hvis der ifølge forsøgsprotokollen skal aflives dyr under forsøget, skal det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, der påregnes aflivet.

Man kan samtidig udsætte en satellitgruppe på ti dyr (fem af hvert køn) for den højeste dosis i 28 dage og gennem en periode på 14 dage efter forsøget observere, om der er reversible, varige eller forsinkede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe på ti kontroldyr (fem af hvert køn).

1.4.2.3. Dosisniveauer

Der anvendes generelt mindst tre forsøgsgrupper og en kontrolgruppe. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra indgiften af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til indgift af teststoffet, skal kontrolgruppen indgive vehiklet det største af de anvendte volumina.

Hvis der ud fra andre data ikke kan ventes virkninger ved en dosis på 1 000 mg/kg legemsvægt/dag, kan der gennemføres en grænsetest. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres en »range finding«-undersøgelse til bestemmelse af de doser, der skal anvendes.

Dosisniveauerne udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om teststoffet eller beslægtede stoffers toksicitet og (toksiko)kinetik. Den højeste dosis vælges med henblik på fremkaldelse af toksiske effekter, men ikke død eller alvorlig lidelse. Normalt vælges en faldende række dosisniveauer til påvisning af eventuelt dosisafhængigt respons og niveau hvor skadelige effekter ikke kan observeres ved det laveste dosisniveau (NOAEL). Det optimale interval mellem to doser er ofte en faktor på 2-4, og tilføjelse af en fjerde forsøgsgruppe er ofte at foretrække frem for anvendelse af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 10) mellem dosisniveauerne.

For stoffer, der indgives med foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de anvendte mængder af teststoffet ikke har indflydelse på den normale ernærings- eller væskebalance. Hvis teststoffet indgives med foderet, kan man enten anvende en konstant koncentration i foderet (ppm) eller en konstant dosering i forhold til dyrenes vægt; det benyttede alternativ bør specificeres. Hvis teststoffet indgives med mavesonde, gøres dette på samme tidspunkt hver dag. Doserne justeres, så de er konstant i forhold til dyrenes legemsvægt.

Hvis en undersøgelse med gentagen dosis anvendes som en forundersøgelse forud for en langtidsundersøgelse, bør foderet være det samme i begge undersøgelser.

1.4.2.4. Grænsetest

Hvis en test med et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag eller, ved indgift gennem foder eller drikkevand, en tilsvarende procentdel i foderet eller drikkevandet (baseret på bestemmelse af legemsvægten), udført efter nedenstående fremgangsmåde, ikke fremkalder erkendbare toksiske virkninger, og hvis der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan en fuldstændig undersøgelse med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendig. I dette tilfælde bør grænsetesten anvendes, medmindre human eksponering viser, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

1.4.2.5. Observationsperiode

Observationsperioden varer 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage uden indgift af teststof, således at det kan registreres, om der er forsinkede, vedvarende eller reversible toksiske virkninger.

1.4.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene indgives teststoffet dagligt syv dage om ugen i en periode på 28 dage; fem dages dosering pr. uge skal begrundes. Hvis teststoffet indgives med sonde, skal dette gøres i en enkelt dosis med anvendelse af mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, som kan indgives ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumen bør ikke overstige 1 ml/100 g legemsvægt, undtagen for vandige opløsninger, hvor 2 ml/100 g legemsvægt kan anvendes. Med undtagelse af irriterende eller ætsende stoffer, som normalt vil afsløre stærkere virkninger med højere koncentrationer, bør variationen i testvolumen minimeres ved at justere koncentrationen således, at der sikres en konstant volumen ved alle dosisniveauer.

1.4.3.1. Generelle observationer

Der foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, om muligt på det eller de samme tidspunkter hver dag og under hensyntagen til, hvornår de forventede virkninger efter dosering er stærkest. Dyrenes sundhedstilstand registreres. Dyrene observeres for sygelighed og dødelighed mindst to gange om dagen. Døende og stærkt lidende dyr fjernes, så snart de observeres, aflives humant og obduceres.

Én gang før den første eksponering (med henblik på individbaserede sammenligninger) og mindst én gang om ugen derefter foretages der indgående kliniske observationer af alle dyrene. Med henblik på disse observationer tages dyrene ud af deres egne bure og anbringes i et standardindelukke; Observationerne udføres om muligt på samme tidspunkt hver gang. De registreres omhyggeligt, om muligt med anvendelse af scoringssystemer, hvis anvendelse skal være klart defineret af forsøgslaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at forsøgsbetingelserne varierer minimalt, og at observationerne om muligt foretages af observatører, der ikke har kendskab til behandlingen. Observationerne bør bl.a. være rettet mod ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Tillige registreres ændringer i gang, holdning og reaktion på håndtering såvel som forekomsten af kloniske eller toniske bevægelser, stereotyp optræden (f.eks. overdreven soignering, stadig kredsen i cirkelbevægelser) eller mærkelig adfærd (f.eks. automutilation, baglæns gang).

I den fjerde eksponeringsuge vurderes reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli), gribestyrke og motorisk aktivitet. Litteraturen indeholder yderligere oplysninger om de undersøgelsesmetoder, der kan anvendes (se den generelle indledning til afsnit B).

Funktionelle observationer i den fjerde eksponeringsuge kan udelades, hvis undersøgelsen gennemføres som en forundersøgelse til en efterfølgende undersøgelse af subkronisk toksicitet (90 dage). I så fald medtages de funktionelle observationer i den opfølgende undersøgelse. På den anden side kan data vedrørende funktionelle observationer fra undersøgelsen med gentagen dosis lette valget af dosisniveauer for en efterfølgende undersøgelse af subkronisk toksicitet.

I undtagelsestilfælde kan funktionelle observationer ligeledes udelades for grupper, der viser så tydelige tegn på toksicitet, at det i signifikant grad ville indvirke på resultaterne af den funktionelle test.

1.4.3.2. *Legemsvægt og indtagelse af føde/vand*

Alle dyrene vejes mindst én gang om ugen. Indtagelsen af føde og vand måles mindst én gang om ugen.

1.4.3.3. Hæmatologi

Følgende hæmatologiske undersøgelser foretages ved forsøgsperiodens afslutning: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og en måling af koaguleringsevne/tid.

Der tages blodprøver fra et bestemt, angivet sted, lige inden eller i forbindelse med aflivning af dyrene; prøverne opbevares under passende betingelser.

1.4.3.4. Klinisk biokemi

Klinisk biokemiske bestemmelser med henblik på undersøgelse af vigtige toksiske virkninger i væv, og navnlig i nyrer og lever, foretages med blodprøver, der udtages fra alle dyr lige inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning (bortset fra dem, der er fundet døende og/eller som er aflivet under forsøget). Det anbefales at dyrene faster natten over forud for blodprøvetagning (1). Undersøgelser af plasma eller serum skal omfatte natrium, kalium, glukose, total kolesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Målinger af yderligere enzymer (fra lever eller andre organer) og galdesyrer kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger.

(1) For en række målinger i serum og plasmaer skal dyrene helst have fastet natten over. Den vigtigste årsag hertil er, at den øgede variation i resultaterne, som manglende faste uundgåeligt medfører, vil kunne skjule de mindre tydelige effekter og gøre fortolkningen vanskelig. På den anden side kan faste indvirke på dyrenes generelle stofskifte og vil, navnlig i ernæringsundersøgelser, forstyrre den daglige eksponering for teststoffet. Hvis der benyttes faste, bør analyserne udføres efter de funktionelle observationer i forsøgets fjerde uge.

Følgende urinanalyser kan eventuelt udføres i forsøgets sidste uge til bestemmelse af: udseende, volumen, osmolalitet eller specifik vægtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller.

Endvidere bør det overvejes at gennemføre undersøgelser af serummarkører for generelle vævsskader. Andre bestemmelser, der bør foretages, hvis teststoffets kendte egenskaber kan eller forventes at kunne indvirke på tilsvarende metaboliske funktioner, omfatter kalcium, fosfat, triglycerider ved faste, visse hormoner, methæmoglobin og cholinesterase. Disse forhold undersøges for stoffer i bestemte stofgrupper eller fra tilfælde til tilfælde.

Der er generelt brug for en fleksibel fremgangsmåde, afhængigt af dyreart og de observerede og/eller forventede effekter ved et givet stof.

Hvis der ikke foreligger passende data fra tidligere undersøgelser, bør det overvejes at bestemme hæmatologiske og klinisk biokemiske variable, inden eksponering påbegyndes.

1.4.3.5. Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene underkastes en fuldstændig og tilbundsgående makroskopisk undersøgelse, der omfatter omhyggelig undersøgelse af kroppens ydre, alle åbninger samt af kraniehule, brysthule og bughule og indholdet heraf. Lever, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, thymus, milt, hjerne og hjerte fra alle dyr befries for alt vedhængende væv og vejes hurtigst muligt efter udtagning, så udtørring undgås.

Følgende væv præserveres i det bedst egnede fikseringsmiddel både med hensyn til vævstype og den påtænkte efterfølgende histopatologiske undersøgelse: alle makroskopiske læsioner, hjerne (repræsentative regioner, herunder cerebrum, cerebellum og pons), rygmarv, mavesæk, tyktarm og tyndtarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, thymus, skjoldbruskkirtel, spiserør og lunger (præserveret ved oppumpning med fikseringsmiddel og efterfølgende immersion), gonader, sekundære kønsorganer (f.eks. uterus, prostata), urinblære, lymfeknuder (om muligt en lymfeknude, der har berøring med indgiftsvejen, og en anden lymfeknude langt fra indgiftsvejen, som kan vise systemiske virkninger), perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen, og et knoglemarvssnit (eller som alternativt et nyligt præpareret knoglemarvsaspirat). De kliniske og øvrige resultater kan vise, at der er behov for at undersøge yderligere væv. Også organer, der på grundlag af teststoffets kendte egenskaber kan forventes at være målorganer, præserveres.

1.4.3.6. Histopatologisk undersøgelse

Der foretages en fuldstændig histologisk undersøgelse af de præserverede organer og væv fra alle dyr i kontrolgruppen og i højdosis-gruppen. I disse undersøgelser inddrages dyr fra alle de andre dosisgrupper, hvis der i højdosis-gruppen observeres eksponeringsrelaterede ændringer.

Alle makroskopiske læsioner undersøges.

Bruges der en satellitgruppe, udføres der en histopatologisk undersøgelse af væv og organer, der udviser toksisk virkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Der tilvejebringes data for hvert enkelt dyr. Derudover opstilles alle data i tabelform, som for hver gruppe viser antallet af dyr ved begyndelsen af forsøget, antallet af dyr, der er fundet døde under forsøget eller aflivet af humane årsager, og tidspunktet for dødsfald eller human aflivning, antal dyr, der viser tegn på toksicitet, en beskrivelse af de observerede tegn på toksicitet, herunder tidspunktet for de toksiske virkningers indtræden, varigheden og styrke, antallet af dyr, der udviser læsioner, typen af læsioner, og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type læsion.

Numeriske resultater vurderes om muligt med en passende og generelt accepteret statistisk metode. De statistiske metoder udvælges i forbindelse med forsøgets tilrettelæggelse.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, laboratoriemiljø, foder osv.

— hvert enkelt dyrs vægt ved forsøgets påbegyndelse, herefter med ugentlige mellemrum og ved forsøgets afslutning.

Forsøgsbetingelser:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om formulering af teststof eller tilblanding heraf i foderet, opnået koncentration, foderblandingens stabilitet og homogenitet

— oplysninger om stoffets indgift

— omregning af teststoffets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg/kg/legemsvægt/dag), hvis relevant

— oplysninger om foder- og vandkvalitet.

Resultater:

— legemsvægt/ændringer i legemsvægt

— foderindtagelse og vandindtagelse, hvis relevant

— oplysninger om toksiske reaktioner efter køn og dosis, herunder tegn på toksicitet

— de kliniske observationers art, styrke og varighed, reversible og ikke-reversible

— vurdering af sanseevne, gribestyrke og motorisk aktivitet

— hæmatologiske tests med relevante referenceværdier

— klinisk biokemiske tests med relevante referenceværdier

— legemsvægt ved aflivning og organvægte

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— oplysninger om absorption, hvis disse foreligger

— statistisk behandling af resultaterne, hvis relevant.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

Denne metode svarer til TG 407 fra OECD.«

B.8. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, INHALATION)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Det er nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets partikelstørrelsesfordeling, damptryk, smeltepunkt, kogepunkt, flammepunkt og eventuelle eksplosive egenskaber.Se også den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Flere grupper af forsøgsdyr udsættes i 28 dage dagligt i en angivet periode for teststoffet i graduerede koncentrationer, idet hver gruppe eksponeres for en bestemt koncentration.Anvendes der et vehikel til at frembringe en passende koncentration af teststoffet i luften, bør der i forsøget indgå en kontrolgruppe, der udsættes for vehiklet alene. I eksponeringsperioden observeres dyrene dagligt for symptomer på toksisk virkning. Dyr, der dør under forsøget, obduceres, og ved forsøgets afslutning aflives og obduceres de overlevende dyr.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget begyndes. Unge sunde dyr fordeles randomiseret i det fornødne antal grupper. Om nødvendigt kan der tilsættes et egnet vehikel til teststoffet, således at der opnås en passende koncentration af teststoffet i luften. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere data benyttes.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Rotter er de foretrukne forsøgsdyr, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes unge sunde rotter af almindeligt anvendte stammer.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst 10 dyr (fem hunner og fem hanner) i hver forsøgsgruppe. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, skal det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig udsætte en satellitgruppe på 10 dyr (fem af hvert køn) for den højeste koncentration i 28 dage og gennem en periode på 14 dage efter forsøget observere, om der er reversible, varige eller sent opståede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe på 10 kontroldyr (fem af hvert køn).

1.6.2.3. *Eksponeringskoncentrationer*

Der skal anvendes mindst tre koncentrationsniveauer og en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe (svarende til koncentrationen af vehiklet i højeste dosisniveau), såfremt der benyttes vehikel. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra inhalation af teststoffet. Den højeste koncentration bør have toksisk virkning, men kun medføre få eller ingen dødsfald. Der må ikke være tegn på toksisk virkning ved den laveste koncentration. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal den laveste koncentration overskride denne eksponering. Middelkoncentrationen skal helst frembringe så svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre koncentrationer, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel koncentration og i kontrolgrupperne skal dødeligheden holdes på et lavt niveau, så der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

1.6.2.4. *Eksponeringstid*

Den daglige eksponeringsperiode er seks timer, men det kan være nødvendigt at benytte kortere eller længere perioder for at imødekomme specielle krav.

1.6.2.5. *Udstyr*

Dyrene testes med inhalationsapparatur, der er udformet således, at der kan opretholdes en dynamisk luftcirkulation med et luftskifte på mindst 12 gange pr. time samtidig med et tilstrækkeligt iltindhold og jævn fordeling af eksponeringsluften. Benyttes der eksponeringskammer, skal det være således indrettet, at forsøgsdyrene sammenklumpes mindst muligt og eksponeres mest muligt for teststoffet ved inhalation. Den generelle regel for sikkerhed for stabil atmosfære er, at dyrenes totale »volumen« ikke må overstige 5 % af eksponeringskammerets volumen. Eksponeringen kan foregå gennem mund-næse, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen; ved anvendelse af de to første muligheder opnår man, at optagelsen af teststoffet ad andre veje minimeres.

1.6.2.6. *Observationsperiode*

Dyrene observeres dagligt for symptomer på toksiske virkninger i hele forsøgsperioden og restitutionsperioden. Dødstidspunkt og tidspunkter for toksicitetssymptomers fremkomst og forsvinden registreres.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene eksponeres for teststoffet dagligt 5—7 dage om ugen i en periode på 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage, efter at eksponering for teststoffet er ophørt, således at det kan registreres, om toksiske virkninger er reversible, eller om de vedvarer. Temperaturen under forsøget holdes på 22 °C ± 3 °C.

Under ideelle forhold skal den relative luftfugtighed holdes på mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfælde (f.eks. ved testning af visse aerosoler) kan det være praktisk uigennemførligt. Udsivning af teststof til omgivelserne kan forhindres ved, at der i kammeret holdes et svagt undertryk ($\leq$ 5 mm vandsøjle). Der gives hverken foder eller vand under eksponeringen.

Der anvendes et dynamisk inhalationssystem med et passende analytisk kontrolsystem til sikring af eksponeringskoncentrationen. Det anbefales at foretage en prøvetest for at finde frem til passende eksponeringskoncentrationer. Lufthastigheden tilpasses, således at der er ensartede forhold i hele eksponeringskammeret. Systemet skal være af en sådan beskaffenhed, at der så hurtigt som muligt opnås stabile eksponeringsbetingelser.

Der foretages måling og kontrol af:

(a) lufthastighed (kontinuerlig)

(b) den faktiske koncentration af teststoffet målt i opholdsarealet. Koncentrationen må under den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end ± 15 % fra gennemsnitskoncentrationen. Det kan være umuligt at opnå en sådan grad af kontrol med visse aerosoler, og i så tilfælde kan større udsving accepteres. Koncentrationerne bør fra dag til dag holdes så konstante som muligt under hele forsøgets forløb. For aerosoler analyseres partikelstørrelsen mindst én gang ugentligt pr. forsøgsgruppe.

(c) temperatur og luftfugtighed, om muligt kontinuerligt.

Under og efter eksponering foretages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Alle dyr observeres dagligt, og toksicitetssymptomer registreres, herunder hvornår disse symptomer optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og det centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønsteret. Dyrene vejes én gang om ugen. Det anbefales, at der også holdes regnskab med den ugentlige fødeindtagelse. Dyrene observeres med jævne mellemrum, så dyr ikke går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets slutning aflives og obduceres alle overlevende dyr med undtagelse af dem i satellitgruppen. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

Ved forsøgets afslutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes følgende undersøgelser:

(i) hæmatologisk analyse omfattende mindst hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling og et mål for koaguleringsevnen.

(ii) klinisk biokemisk blodanalyse omfattende mindst én lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein.

Andre bestemmelser, der kan være påkrævet for en fyldestgørende toksikologisk vurdering, er calcium, phosphor, chlorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin og cholinesteraseaktivitet.

Der kan udføres yderligere klinisk biokemiske analyser, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

1.6.3.1. *Makroskopisk undersøgelse*

Alle forsøgsdyrene underkastes en fuldstændig makroskopisk undersøgelse. Lever, nyrer, binyrer, lunger og testes vejes så hurtigt som muligt efter udtagning, så udtørring undgås. Væv og organer (luftveje, lever, nyrer, milt, testes, binyrer, hjerte og organer, der udviser makrokopiske læsioner eller størrelsesforandringer) opbevares i et passende medium med henblik på eventuel senere histopatologisk undersøgelse. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fixativ for at sikre, at lungestrukturen bevares.

1.6.3.2. *Histopatologisk undersøgelse*

Der foretages en histologisk undersøgelse af præpareret væv og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har været udsat for den højeste koncentration. Observeres der i gruppen med den højeste koncentration vævs- eller organdefekter, som kan tilskrives teststoffet, undersøges de samme væv og organer i grupperne med lavere koncentration. Dyrene i en eventuel satellitgruppe underkastes en histologisk undersøgelse, især de væv og organer, der udviser toksisk virkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, og for hver type af læsion det antal dyr, der udviser den pågældende læsion.

Evaluering af samtlige observationer skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder o.s.v.

— forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af eksponeringsudstyret, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et eksponeringskammer, når et sådant benyttes. Apparatur til måling af temperatur, fugtighed og i givet fald aerosolkoncentrationens stabilitet eller partikelstørrelse skal beskrives.

Eksponeringsdata:

Disse skal opstilles i tabelform med angivelse af middelværdier og et mål for variationen (f.eks. standardafvigelser) og i videst muligt omfang omfatte:

a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret

b) luftens temperatur og fugtighed

c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparaturet, divideret med luftvolumen)

d) type vehikel, hvor et sådant er anvendt

e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget

f) massemedianen af den aerodynamiske diameter (MMAD) og den geometriske standardafvigelse (GSD)

— oplysninger om toksisk reaktion opdelt efter køn og koncentration

— angivelse af dyrenes dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning

— beskrivelse af toksiske og andre virkninger; nuleffektniveau

— for hvert enkelt abnormitetstegn det tidspunkt, hvor det er observeret, og dets senere udvikling

— foder- og legemsvægt

— hæmatologiske analyser og samtlige resultater

— klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

B.9. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, DERMAL)

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet påføres dagligt huden i graduerede doser på grupper af forsøgsdyr, idet der anvendes en bestemt dosis til hver gruppe gennem en periode på 28 dage. I eksponeringsperioden observeres dyrene dagligt for symptomer på toksisk virkning. Dyr, der dør under forsøget, obduceres, og ved forsøgets afslutning aflives og obduceres de overlevende dyr.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge sunde dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper, inden forsøget sættes i gang. Kort før forsøget indledes, klippes dyrene på ryggen. Såfremt dyrene barberes, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Klipningen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipning og barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af kroppens overflade klargøres til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, så der sikres god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet. Teststoffet påføres dagligt 5-7 dage om ugen.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Der kan anvendes voksne rotter, kaniner eller marsvin. Der kan også anvendes andre dyrearter, men i så fald skal det begrundes.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst 10 dyr (fem hunner og fem hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, skal det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig udsætte en satellitgruppe på 10 dyr (fem af hvert køn) for den højeste dosis i 28 dage og gennem en periode på 14 dage efter forsøget observere, om der er reversible, varige eller forsinkede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe på 10 kontroldyr (fem af hvert køn).

1.6.2.3. *Dosisniveauer*

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, såfremt der benyttes vehikel. Eksponeringsperioden er på mindst seks timer dagligt. Teststoffet påføres på omtrent samme tidspunkt hver dag, og doserne justeres med jævne mellemrum (én gang eller to gange om uge), så de er konstante i forhold til dyrenes legemsvægt. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra påføring af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, skal vehikelkontrolgruppen eksponeres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk virkning, men kun medføre få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk virkning overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Middeldosis skal helst frembringe så svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre dosisniveauer, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel dosis og i kontrolgrupperne skal dødeligheden holdes på et lavt niveau, så der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis påføring af teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, sænkes koncentrationen, hvilket kan medføre, at andre toksiske virkninger på det højeste dosisniveau svækkes eller forsvinder. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at afslutte forsøget og foretage et nyt forsøg med lavere koncentrationer.

1.6.2.4. *Grænsetest*

Hvis der i en indledende undersøgelse med en dosis på 1 000 mg/kg legemsvægt eller en større dosis fastsat ud fra kendskab til den eksponering, mennesker kan blive udsat for, ikke konstateres nogen toksisk virkning, kan yderligere test betragtes som unødvendige.

1.6.2.5. *Observationsperiode*

Dyrene observeres dagligt for symptomer på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkter for toksicitetssymptomers fremkomst og forsvinden registreres.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene holdes i hver sit bur. Den ideelle dosering består i påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage uden påføring af teststof, således at det kan registreres, om toksiske virkninger er reversible, eller om de vedvarer. Den daglige eksponeringsperiode er på mindst seks timer.

Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet skal påføres så tyndt og ensartet over en så stor del af området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden tildækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, så at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstændig immobilisering ikke anbefales. Alternativt kan der benyttes en beskyttelseskrave.

Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.

Alle ddy observvvres daagigt, oggtoosicitetssymptomer reeiitreres, heruudee hvornår disse symptomer optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønsteret. Dyrene vejes én gang om ugen. Det anbefales, at der også holdes regnskab med den ugentlige fødeindtagelse. Dyrene observeres med jævne mellemrum, så dyr ikke går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets slutning aflives og obduceres alle overlevende dyr med undtagelse af dem i satellitgrupperne. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

Ved forsøgets afslutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes følgende undersøgelser:

1) hæmatologisk analyse omfattende mindst hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling og et mål for koaguleringsevnen.

2) klinisk biokemisk blodanalyse omfattende mindst én lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein.

Andre bestemmelser, der kan være påkrævet for en fyldestgørende toksikologisk vurdering, er calcium, phosphor, chlorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin og cholinesteraseaktivitet.

Der kan udføres yderligere klinisk biokemiske analyser, hvor det skønnes nødvendigt for videre undersøgelse af observerede virkninger.

1.6.4. Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene underkastes en fuldstændig makroskopisk undersøgelse. Lever, nyrer, binyrer testes og vejes så hurtigt som muligt efter udtagningen, så udtørring undgås. Væv og organer, d.v.s. normal og eksponeret hud, lever, nyrer, milt testes, binyrer, hjerte og målorganer (d.v.s. organer, der udviser makroskopiske læsioner eller forandringer i størrelse) opbevares i et passende medium med henblik på eventuel senere histopatologisk undersøgelse.

1.6.5. Histopatologisk undersøgelse

Der foretages en histologisk undersøgelse af præpareret væv og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har været udsat for den største dosis. Observeres der i gruppen med den højeste dosis vævs- eller organdefekter, som kan tilskrives teststoffet, undersøges de samme væv og organer i grupperne med lavere dosis. Dyrene i satellitgruppen underkastes en histologisk undersøgelse, især de væv og organer, der udviser virkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antallet af dyr ved begyndelsen af forsøget, og for hver type læsion det antal dyr, der udviser den pågældende læsion.

Evaluering af samtlige observationer skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder o.s.v.

— forsøgsbetingelser (herunder forbindingstypen: med eller uden okklusion)

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration

— nuleffektniveau, hvor det er muligt

— oplysninger om toksiske reaktioner opdelt efter køn og dosis

— angivelse af dyrenes dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning

— toksiske og andre virkninger

— for hvert enkelt abnormitetstegn det tidspunkt, hvor det er observeret, og dets senere udvikling

— foder- og legemsvægt

— hæmatologiske analyser og samtlige resultater

— klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt D).

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B (punkt E).

»B.10. MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I CELLER FRA PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 473 In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. INDLEDNING

Formålet med in vitro-testen for kromosomaberrationer er at påvise, om et stof eller andet forårsager strukturelle kromosomafvigelser i dyrkede pattedyrceller (1) (2) (3). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelser. Den foreliggende metode er imidlertid ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til dette formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgsdyr.

I in vitro-testen for kromosomaberrationer kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer, cellestammer eller primære cellekulturer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning, karotypens stabilitet, kromosomtal, kromosomdiversitet og hyppighed af spontane kromosomaberrationer.

Ved udførelse af in vitro-test er det i reglen nødvendigt at benytte en exogen kilde til metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændig efterligne betingelserne i et levende pattedyr. Man må omhyggeligt undgå betingelser, som fører til et positivt resultat, der ikke skyldes selve mutageniciteten, men kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoksicitet (4) (5).

Testen benyttes til at screene for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der giver positivt resultat med denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, men der er ikke fuldstændig korrelation mellem testen og carcinogenicitet. Korrelationen afhænger af den kemiske sammensætning, og der er stadig tydeligere tegn på, at nogle carcinogener ikke påvises ved denne test, fordi de lader til at virke ved andre mekanismer end direkte beskadigelse af dna.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Endofordobling: en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i dna-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor forskydning af kromatiderne er minimal.

Mitoseindeks: forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; det viser populationens formeringsgrad.

Antalsafvigelse: ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Cellekulturer udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Efter forud fastsatte tidsrum efter at være udsat for teststoffet behandles kulturerne med et metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin), hvorefter de høstes og farves; dernæst undersøges metafasecellerne mikroskopisk for forekomst af kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Celler*

Der kan benyttes en række forskellige cellelinjer, -stammer og primære cellekulturer, herunder humane celler (f.eks. fibroblaster fra kinesisk hamster eller perifere blodlymfocytter fra det perifere blod hos mennesker eller andre pattedyr).

1.4.1.2. *Substrater og dyrkningsforhold*

Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes der egnede dyrkningssubstrater og inkuberingsbetingelser (dyrkningsflasker, CO_2-koncentration, temperatur og luftfugtighed). Etablerede cellelinjer og -stammer kontrolleres regelmæssigt for stabilt karakteristisk kromosomtal og mycoplasmakontaminering; i tilfælde af kontaminering anvendes kulturen ikke. Cellernes normale cyklustid og dyrkningsbetingelserne skal være kendt.

1.4.1.3. *Fremstilling af kulturer*

Etablerede cellelinjer og -stammer: celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningssubstrat med en sådan tæthed, at kulturerne ikke flyder sammen inden høst, og inkuberes ved 37 °C.

Lymfocytter: fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller lymfocytter fra sunde individer tilsættes til dyrkningssubstratet, der indeholder et mitogen (f.eks. phytohæmagglutinin), og inkuberes ved 37 °C.

1.4.1.4. *Metabolismeaktivering*

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9), eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (10) (11) (12).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10% (v/v) i det færdige testsubstrat. Et metabolismeaktiveringssystems beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. Testbetingelser

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes med tilsætning af molekylsi.

1.4.2.2. *Eksponeringskoncentrationer*

Stoffets cytotoksicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoksiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. konfluens, antal levedygtige celler eller mitoseindeks. Der kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

Der benyttes mindst 3 analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytoksicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højst er adskilt med en faktor mellem 2 og $\sqrt{10}$. På højsttidspunktet skal konfluens, celleantal eller mitoseindeks være faldet signifikant ved den højeste koncentration (mere end 50 %). Mitoseindekset er kun et direkte mål for cytotoksisk/cytostatisk virkning og afhænger af, hvor lang tid der er forløbet efter behandlingen. Mitoseindeks er dog acceptabel for dyrkning i rystekolber, hvor andre toksicitetsmål er besværlige eller ubrugelige i praksis. Oplysninger om cellecyklens kinetik, såsom den gennemsnitlige generationstid (AGT), kan benyttes som supplerende information. AGT er imidlertid et overordnet gennemsnit, der ikke altid afslører forsinkede subpopulationer, og selv en lille forøgelse af den gennemsnitlige generationstid kan føre til en meget betydelig forsinkelse af tidspunktet for optimalt udbytte af aberrationer.

For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoksiske, må testkoncentrationen højst være 5 µl/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

For forholdsvis uopløselige stoffer, der ikke er toksiske ved koncentrationer under opløselighedsgrænsen, skal der som højeste dosis benyttes en koncentration, der er højere end opløselighedsgrænsen i det samlede dyrkningssubstrat ved behandlingens afslutning. I nogle tilfælde (f.eks. når toksicitet kun optræder over den laveste koncentration med uopløselighed) tilrådes det at gennemføre testen ved mere end én koncentration med synlig udfældning. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler S9, serum mv. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3. *Negative og positive kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

I positive kontrolprøver benyttes der et kendt clastogen i en mængde, der forventes at give reproducerbar og påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne, hvorved testsystemets følsomhed godtgøres.

Der vælges sådanne koncentrationer i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Metabolismeaktivering	Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Ingen exogen metabolismeaktivering	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitroquinoline-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Exogen metabolismeaktivering	Benzo[a]pyrene	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
	Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal i hver høst indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærestof, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3. **Fremgangsmåde**

1.4.3.1. *Behandling med teststof*

Celler under formering behandles med teststoffet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem. Behandling af lymfocytter påbegyndes ca. 2 døgn efter stimulering med mitogen.

1.4.3.2. Der benyttes normalt dobbeltbestemmelse ved hver koncentration, hvilket også stærkt tilrådes for negative kontrolprøver (kontrolprøver med opløsningsmiddel). Hvis det på grundlag af tidligere forsøg kan godtgøres, at forskellen mellem dobbeltbestemmelser (13) (14) er minimal, kan enkeltbestemmelse ved hver koncentration accepteres.

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (15) (16).

1.4.3.3. *Høst af kulturer*

I det første forsøg udsættes cellerne for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages prøve efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (12). Fører denne protokol til negativt resultat både med og uden aktivering, udføres endnu et forsøg, denne gang med kontinuerlig behandling indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange en normal cellecyklus. Nogle kemiske stoffer er det lettere at bestemme ved behandlings-/prøveudtagningstider på mere end 1,5 gange cellecyklussen. Negativt resultat med metabolismeaktivering skal bekræftes i hvert enkelt tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes.

1.4.3.4. *Kromosompræparering*

Cellekulturerne behandles med Colcemid® eller colchicin normalt 1-3 timer før høst. Høst og kromosompræparering skal foregå særskilt for hver enkelt kultur. Kromosompræpareringen består i hypotonisk behandling af cellerne, fiksering og farvning.

1.4.3.5. *Analyse*

Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet ± 2 for alle celletyper. Der skal bedømmes mindst 200 vel fordelte metafaser pr. koncentration og kontrolgruppe, ligeligt fordelt mellem eventuelle dobbeltprøver. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages høje aberrationstal.

Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere polyploidi og endofordobling, hvis dette konstateres.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Da cellen er forsøgets måleenhed, bedømmes det, hvilken procentdel af cellerne der har ændret kromosomstruktur. Forskellige strukturændringer noteres med antal og hyppighed for både forsøgs- og kontrolkulturer. Gaps noteres særskilt og registreres, men medregnes normalt ikke i den samlede aberrationshyppighed.

Sideløbende målinger af cytotoksicitet for alle behandlede og negative kontrolkulturer i hovedforsøget registreres ligeledes.

Dataene præsenteres for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Der er redegjort for behovet for bekræftelse af negative resultater i punkt 1.4.3.3. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktiveringen.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for opnåelse af et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse eller en reproducerbar forøgelse af antallet af celler med kromosomaberrationer. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (3) (13). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

En forøgelse i antallet af polyploide celler kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkaldte kromosomantalsafvigelser. En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere cellecyklussens forløb (17) (18).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Celler:

— celltype og -kilde

— den valgte celletypes karyotypiske karakteristika og egnethed

— eventuelt fravær af mycoplasma

— oplysninger om cellecyklussens længde

— bloddonorers køn, fuldblod eller fraseparerede lymfocytter samt benyttet mitogen

— eventuelt antal passager

— eventuelle metoder til vedligehold af cellekulturer

— normalt kromsomtal

Testbetingelser:

— det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og længden af cellernes udsættelse for stoffet

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— substratsammensætning og eventuel CO_2-koncentration

— teststoffets koncentration

— volumen af tilsat bærestof og teststof

— inkuberingstemperatur

— inkuberingstid

— behandlingens varighed

— celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— positive og negative kontrolprøver

— metoder til præparering af objektglas

— kriterier for bedømmelse af aberrationer

— antal analyserede metafaser

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet, f.eks. konfluens, cellecyklusdata, celletælling og mitoseindeks

— tegn på udfældning

— data om pH og osmolalitet i behandlingsmediet, hvis disse værdier er målt

— definitioner af aberrationer, herunder gaps

— antal celler med kromosomaberrationer og typen af disse, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur

— eventuel iagttaget ændring i ploidigrad

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427-432.

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environs. Molec. Mutagen 10* (suppl. 10), pp. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res., 257*, pp. 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res., 268*, pp. 297-305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res., 31*, pp. 347-364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res., 113*, pp. 173-215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, *37*, pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, *66*, pp. 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, *7*, pp. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, *312*, pp. 241-261.

(13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, *312*, pp. 139-149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, *5*, pp. 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, *119*, pp. 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, *43*, pp. 1362-1364.»

»B.11. MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I KNOGLEMARV HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 475 »Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

In vitro-testen for kromosomaberrationer hos pattedyr benyttes til at påvise, om et teststof forårsager strukturelle kromosomafvigelser i knoglemarvceller hos dyr, normalt gnavere (1) (2) (3) (4). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelser. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromosomtypen, men også ændringer af kromatidtypen forekommer. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgssystemer.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Knoglemarv er målvævet i denne test, da det er et væv med høj vaskularisation og består af celler med kort cyklustid, som er lette at isolere og behandle. Metoden omfatter ikke andre arter og væv.

Denne test for kromosomaberrationer er særlig relevant for en vurdering af risikoen for mutationsfremkaldelse, da den giver mulighed for at tage sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser i betragtning, selv om de kan variere fra art til art og fra væv til væv. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromsomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Endofordobling: en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Gap: en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

Antalsafvigelse: ændring af kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater of knoglemarvceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis rotter, mus og kinesiske hamstere, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fordring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60 %.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage.

1.4.1.4. *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser

dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid Cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethylenmelamin	51–18–3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontrolgrupper, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof, og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr og hyppighed af celler med kromosomafvigelser. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærestof ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare dyr af hvert køn. Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives fortrinsvis i en enkelt dosis. De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

Der udtages prøver på to tidspunkter efter endagsbehandling. For gnavere udtages første prøve normalt 1,5 normal cellecykluslængde (som normalt er 12-18 timer) efter behandlingen. Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af teststoffet, og af teststoffets indvirkning på cellecyklussens kinetik, anbefales det at udtage endnu en prøve 24 timer efter den første. Indgives stoffet over mere end én dag, udtages der blot én prøve, når der er gået 1,5 normal cellecykluslængde efter den sidste behandling.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøve af forsøgsdyrene efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. tre-fem timer, for kinesisk hamster ca. fire-fem timer. Cellerne høstes fra knoglemarven og analyseres for kromosomaberrationer.

1.5.3. Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (5). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. mitoseindeks nedsat med mere end 50 %).

1.5.4. Grænsetest

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. For længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. Indgift af doser

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. Præparering af kromosomer

Umiddelbart efter aflivningen udtages knoglemarven, som udsættes for hypotonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7. Analyse

Mitoseindekset bestemmes som udtryk for cytotoksiciteten i mindst 1 000 celler pr. dyr for alle behandlede dyr (inkl. positive kontroldyr) og ubehandlede (negative) kontroldyr.

For hvert dyr bør mindst 100 celler analyseres. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet 2n ± 2.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte celler, antallet af aberrationer pr. celle og den procentdel af cellerne, der har kromosomaberrationer. Forskellige typer strukturelle kromosomændringer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (6). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

En forøgelse af ploiditetsgraden kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at fremkalde kromosomantalsafvigelser. En forøget endofordobling kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere cellecyklussens forløb (7) (8).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vivo-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art. At negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr samt deres alder og køn

— oprindelse, miljø, føde mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for indgiftsvej

— eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed

— metoder til præparering af objektglas

— kriterier for bedømmelse af aberrationer

— antal analyserede celler pr. dyr

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet

— mitoseindex

— antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr

— samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse

— antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse

— eventuel iagttaget ændring i ploiditetsgrad

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative kontrolprøver

— data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for sideløbende positive kontrolprøver

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENSER

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*. S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C., pp. 275-306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, *189*, pp. 157-165.

(3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston, R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, *312*, pp. 305-312.

(5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/ UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis, 7*, pp. 313-319.

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res. 119*, pp. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1363-1364.«

»B.12. MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR MIKROKERNER I ERYTHROCYTTER HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 474 »Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

In vivo-testen for mikrokerner hos pattedyr benyttes til påvisning af skader, som teststoffet har forvoldt på kromosomer eller mitoseapparatet i erythroblaster, ved analyse af erythrocytter i prøver fra knoglemarv og/eller det perifere blod hos dyr, sædvanligvis gnavere.

Formålet med mikrokernetesten er at påvise stoffer, der forvolder cytogenetiske skader, som medfører dannelse af mikrokerner indeholdende tiloversblevne kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Når en erythroblast i knoglemarven udvikler sig til en polykromatisk erythrocyt, udstødes cellekernen, og en eventuel dannet mikrokerne kan blive tilbage i det ellers kernefri cytoplasma. I disse celler er mikrokerner let synlige, da de ellers ikke har nogen kerne. Forøget forekomst af polykromatiske erythrocytter med mikrokerne hos behandlede dyr er tegn på inducerede kromosomskader.

I denne test benyttes der rutinemæssigt knoglemarv hos gnavere, da der i dette væv produceres polykromatiske erythrocytter. Måling af umodne (polykromatiske) erythrocytter med mikrokerne i det perifere blod kan også accepteres i andre arter, hvor det er vist, at milten ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokerner, eller at deres følsomhed over for stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer, er tilstrækkelig. Mikrokerner kan genkendes på en række kriterier, bl.a. om der er en DNA-centromer til stede. Det vigtigste endpoint er hyppigheden af umodne (polykromatiske) erythrocyter med mikrokerne. Det antal modne (normokromatiske) erythrocytter i det perifere blod, som indeholder mikrokerner, ud af et givet antal modne erythrocytter kan også benyttes som endpoint for testen, når dyrene behandles kontinuerligt i mindst fire uger.

Denne in vivo-test for mikrokerner hos pattedyr er særlig relevant for vurdering af den reelle mutagenitetsfare, idet den tager højde for sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser, selv om disse kan variere fra art til art, væv til væv og genetisk endpoint til genetisk endpoint. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Centromer: region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

Mikrokerner: små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens telofase (meiose) ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Normochromatisk erythrocyt: moden erythrocyt, der mangler ribosomer og kan skelnes fra umodne polykromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

Polychromatisk erythocyt: umoden erythrocyt på et udviklingsmellemstadium, som stadig indeholder ribosomer og derfor kan skelnes fra modne normokromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde. Hvis der benyttes knoglemarv, aflives dyrene på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter knoglemarven udtages, og der fremstilles præparater og farves (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Hvis der benyttes perifert blod, tages der blodprøver på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter der fremstilles udstrygningspræparater og farves (4) (8) (9) (10). I undersøgelser med perifert blod bør der gå så kort tid som muligt mellem sidste eksponering og cellehøst. Præparaterne analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der anbefales mus eller rotter, hvis der bruges knoglemarv, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Bruges der perifert blod, anbefales mus. Dog kan enhver egnet pattedyrart benyttes, hvis dens milt ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokerne, eller hvis den er vist at være tilstrækkelig følsom til at påvise stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20% af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt unge sunde voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning.

1.4.1.4. *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe mikrokerner in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-ethyl-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid Cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontroldyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med mikrokerner. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

Hvis der benyttes perifert blod, kan en forbehandlingsprøve også accepteres som sideløbende negativ kontrolprøve, men kun i de korte undersøgelser (f.eks. 1-3 behandlinger), når de opnåede resultater ligger inden for det forventede interval for den forudgående kontrolprøve.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare dyr af hvert køn (11). Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkelig. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Der kan ikke anbefales nogen standardbehandlingsplan (dvs. 1, 2 eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum). Prøver fra længdervarende indgiftsplaner er acceptable, når blot der i undersøgelsen er påvist en positiv virkning eller — for en negativ undersøgelse — der er påvist toksicitet, eller grænsedosis har været anvendt, og når indgiften er fortsat indtil prøveudtagningen. Prøvestoffet kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen.

Testen kan udføres på følgende to måder:

a) Dyrene behandles med teststoffet én gang. Der udtages prøver af knoglemarv mindst to gange, første gang tidligst 24 timer efter behandlingen, med passende intervaller mellem prøverne, sidste prøve dog senest 48 timer efter behandlingen. Prøveudtagning tidligere end 24 timer efter behandlingen skal

begrundes. Der udtages prøver af perifert blod mindst to gange, tidligst 36 timer efter behandlingen og med passende intervaller efter den første prøve, sidste prøve dog senest efter 72 timer. Når der i en prøve er konstateret positiv reaktion, er yderligere prøveudtagning ikke nødvendigt.

b) Benyttes der to eller flere daglige behandlinger (f.eks. to eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum) udtages der for knoglemarvs vedkommende prøver én gang mellem 18 og 24 timer efter den sidste behandling, og for perifert blods vedkommende én gang mellem 36 og 48 timer efter den sidste behandling (12).

Derudover kan der udtages prøver på andre tidspunkter, hvis det er relevant.

1.5.3. Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (13). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. en nedsættelse af andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter i knoglemarv eller perifert blod).

1.5.4. Grænsetest

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg p. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. For længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. Indgift af doser

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. Præparering af knoglemarv/blod

Knoglemarvceller udtages normalt fra lårben eller skinneben umiddelbart efter aflivningen. Sædvanligvis udtages cellerne fra lårben eller skinneben, hvorefter de præpareres og farves med velkendte metoder. Perifert blod udtages fra halevenen eller et andet egnet blodkar. Blodlegemerne farves straks supravitalt (8) (9) (10), eller der fremstilles udstrygningspræparater, der derefter farves. Ved at bruge en DNA-specifik farvning (f.eks. acridinorange eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) kan man undgå nogle af de artifakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Denne fordel udelukker ikke, at der benyttes konventionelle farvestoffer (f.eks. Giemsa). Supplerende systemer (f.eks. cellulosekolonner til fjernelse af kerneindeholdende celler (16)) kan også benyttes, forudsat at de er påvist at fungere tilfredsstillende ved præparering af mikrokerner i laboratoriet.

1.5.7. Analyse

For hvert dyr bestemmes andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal (umodne og modne) erythrocytter, idet der tælles mindst 200 erythrocytter i alt for knoglemarv og 1 000 erythrocytter for perifert blod (17). Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskope-

ringen. For hvert dyr bedømmes mindst 2 000 umodne erythrocytter for forekomst af umodne erythrocytter med risikokerner. Der kan opnås yderligere information ved bedømmelse af modne erythrocytter for indhold af mikrokerner. Ved analyse af objektglas må andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter ikke være mindre end 20% af kontrolværdien. Når dyrene behandles kontinuerligt i fire uger eller derover, kan også mindst 2 000 modne erythrocytter pr. dyr bedømmes for forekomst af mikrokerner. Systemer til automatisk analyse (billedanalyse og flow-cytometri af celleopslæmninger) er acceptable som alternativer til manuel evaluering, hvis de er behørigt begrundet og valideret.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte umodne erythrocytter, antallet af umodne erythrocytter med mikrokerne og antallet af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter. Hvis dyrene behandles kontinuerligt i mere end fire uger, anføres også dataene for modne erythrocytter, hvis de foreligger. Andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter oplyses for hvert dyr, og, hvis det skønnes hensigtsmæssigt, procentdelen af erythrocytter med mikrokerne. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner hos en enkelt-dosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (18) (19). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af mikrokernetesten viser, at teststoffet fremkalder mikrokerner, som følge af beskadigelse af kromosomer eller mitoseapparat hos erythroblaster i den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder mikrokerner hos umodne erythrocytter i den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr samt deres alder og køn

— oprindelse, miljø, føde mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for indgiftsvej

— eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til præparering af objektglas

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af umodne erythrocytter med mikrokerner

— antal analyserede celler pr. dyr

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet

— andel af umodne erythrocytter i forhold til total erythrocytter

— antal umodne erythrocytter med mikrokerner, anført særskilt for hvert dyr

— gennemsnit ± standardafvigelse for umodne erythrocytter med mikrokerner for hver gruppe

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— anvendte statistiske analyser og metoder

— data for sideløbende og tidligere negative kontrolprøver

— data for sideløbende positive kontrolprøver

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENSER

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res., 18*, pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res., 31*, pp. 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res. 123*, pp. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res., 239*, pp. 29-80.

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res., 189*, pp. 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol. 14*, pp. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res., 245*, pp. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res., 278*, pp. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis, 10*, pp. 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res., 312*, pp. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis, 10*, pp. 313-319.

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis, 7*, pp. 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res., 120*, pp. 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res., 120*, pp. 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res., 213*, pp. 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res., 347*, pp. 97-99.

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, Part I, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.»

»B.13/14. MUTAGENICITET — TILBAGEMUTATIONSTEST MED BAKTERIER

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 471 »Bacterial Reverse Mutation Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der aminosyrekrævede stammer af Salmonella typhimurium og Escherichia coli til at påvise punktmutationer med substitution, addition eller deletion af et eller nogle få DNA-basepar (1) (2) (3). Princippet i denne tilbagemutationstest med bakterier er, at den påviser mutationer, som tilbagemuterer mutationer i teststammerne og dermed sætter bakterien i stand til at syntetisere en essentiel aminosyre. Revertantbakterierne påvises ved deres evne til at vokse uden den aminosyre, som den oprindelige teststamme kræver.

Punktmutationer er årsagen til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og der er meget, der tyder på, at punktmutationer i onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler spiller en rolle for dannelse af tumorer hos mennesker og i forsøgsdyr. Tilbagemutationstesten med bakterier er hurtig, billig og forholdsvis let at udføre. Mange teststammer har forskellige egenskaber, der gør dem mere følsomme til påvisning af mutationer, bl.a. responsive DNA-sekvenser på reversionsstedet, høj cellepermeabilitet for store molekyler og manglende DNA-reparationssystemer eller forstærkede fejlbehæftede DNA-reparationsprocesser. Teststammernes specificitet kan give nyttige oplysninger om, hvilke typer mutationer et gentoksisk stof inducerer. Der findes en meget stor database med resultater for en lang række strukturer med tilbagemutationstest med bakterier, og der er udviklet veletablerede metodologier for test af kemikalier med forskellige fysiske og kemiske egenskaber, herunder flygtige forbindelser.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

En **tilbagemutationstest** med enten Salmonella typhimurium eller Escherichia coli påviser mutation i en aminosyrekrævende stamme (histidin eller tryptophan) til en stamme, der er uafhængig af tilførsel af aminosyren udefra.

Mutagener for baseparsubstitution er stoffer, der forårsager en baseændring i DNA'et. I en tilbagemutationstest kan denne ændring ske samme sted som den oprindelige mutation eller et andet sted i bakteriens genom.

Læserammemutagener er stoffer, der medfører insertion eller deletion af et eller flere basepar i DNA'et, således at RNA'ets læseramme ændres.

1.3. INDLEDENDE OVERVEJELSER

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der prokaroytiske celler, som adskiller sig fra pattedyrceller med hensyn til f.eks. optagelse, metabolisme, kromosomstruktur og DNA-reparationsprocesser. In vitro-test kræver normalt en exogen kilde til metabolismeaktivering. In vitro-metabolismeaktiveringssystemer kan ikke fuldstændig efterligne in vivo-forholdene i pattedyr. Testen vil derfor ikke give direkte oplysninger om et stofs mutagene og carcinogene potentiale i pattedyr.

Tilbagemutationstesten med bakterier anvendes generelt til en indledende screening for gentoksiske virkninger og, især, punktmutationsinducerende aktivitet. Det er ved hjælp af en omfattende database påvist, at mange kemiske stoffer, som giver positivt resultat i denne test, også har mutagen virkning i andre test. Der findes mutagene stoffer, der ikke er påvist ved denne test; årsagen hertil kan tilskrives det påviste endpoints speci-

fikke karakter, forskelle i metabolismeaktivering og forskelle i biotilgængelighed. På den anden side kan faktorer, der øger tilbagemutationstestens følsomhed, føre til et for højt skøn over stoffets mutagene aktivitet.

Tilbagemutationstesten med bakterier kan være uegnet til evaluering af bestemte klasser af kemiske stoffer, f.eks. stærkt baktericide forbindelser (f.eks. visse antibiotika) og forbindelser, der antages (eller vides) at gribe specifikt ind i pattedyrcellers replikationssystem (f.eks. visse topoisomeraseinhibitorer og visse nucleosidanaloger). I sådanne tilfælde kan mutationstest i pattedyr være mere velegnede.

Selv om mange af de stoffer, der er positive i denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, er korrelationen ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de virker via andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Opslæmninger af bakterieceller udsættes for teststoffet med og uden et exogent metabolismeaktiveringssystem. Ved pladeinkorporeringsmetoden blandes disse opslæmninger med en topagar og hældes ud på et minimalsubstrat. Ved præinkubationsmetoden inkuberes behandlingsblandingen, hvorefter den blandes med topagar inden udhældning på minimalsubstrat. For begge metoders vedkommende tælles revertantkolonierne efter 2-3 dages inkubation, og der sammenlignes med antallet af spontane revertantkolonier på kontrolpladerne med opløsningsmiddel.

Der er beskrevet en række fremgangsmåder for udførelse af tilbagemutationstesten med bakterier. Blandt de mest almindeligt benyttede er pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuationsmetoden (9) (10) og suspensionsmetoden (11). Der er beskrevet modifikationer til test af gasser og dampe (12).

De i denne metode beskrevne fremgangsmåder vedrører især pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. De er begge acceptable til udførelse af forsøgene både med og uden metabolismeaktivering. Nogle stoffer, bl.a. kortkædede alifatiske nitrosaminer, divalente metaller, aldehyder, azofarvestoffer og diazoforbindelser, pyrollizidinalkaloider, allylforbindelser og nitroforbindelser (3), kan mest effektivt påvises ved præinkubationsmetoden. Det er også kendt, at visse klasser af mutagener ikke altid påvises ved standardmetoder som f.eks. pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. Sådanne tilfælde bør betragtes som »særtilfælde«, og det anbefales kraftigt at anvende alternative metoder til påvisning i disse tilfælde. Følgende »særtilfælde« er konstateret (samt eksempler på fremgangsmåder, der kan benyttes til påvisning): azofarvestoffer og diazoforbindelser (3) (5) (6) (13), gasser og flygtige stoffer (12) (14) (15) (16) og glycosider (17) (18). Afvigelser fra standardmetoden skal begrundes sagligt.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Præparater**

1.5.1.1. *Bakterier*

Friske bakteriekulturer fremdyrkes til den sidste del af den eksponentielle fase eller til begyndelsen af den stationære fase (ca. 10^9 celler pr. ml). Kulturer sidst i den stationære fase bør ikke benyttes. Det er vigtigt, at de kulturer, der benyttes i forsøgene, har et højt indhold af levedygtige bakterier. Titeren kan godtgøres enten ved hjælp af tidligere kontroldata for vækstkurver eller ved bestemmelse af antallet af levedygtige celler i det enkelte forsøg ved udpladning.

Som inkubationstemperatur anbefales 37 °C.

Der skal benyttes mindst fem bakteriestammer, deriblandt fire stammer af S. typhimurium (TA1535, TA98, TA100 samt TA1537, TA97a eller TA97), som er påvist at være pålidelige, og hvis respons er reproducerbar mellem laboratorier. Disse fire S. typhimurium-stammer har GC-basepar på de primære reversionssted, og det vides, at de ikke altid påviser visse oxiderende mutagener, tværbindende stoffer og hydraziner. Sådanne stoffer kan påvises med E. coli WP2–stammer eller S. typhimurium TA102 (19), som har AT-basepar på det primære reversionssted. Derfor kan følgende kombination af stammer anbefales:

— S. typhimurium TA 1535

— S. typhimurium TA 1537, TA97 eller TA97a

— S. typhimurium TA98

— S. typhimurium TA100

— E. coli WP2 uvrA, E. coli WP2 uvrA (pKM101) eller S. typhimurium TA102.

For at kunne påvise tværbindende mutagener kan det foretrækkes at vælge TA102 eller at tilføje en DNA-reparationsdygtig stamme af E. coli (f.eks. E. coli WP2 eller E. coli WP2 (pKM101)).

Der benyttes anerkendte metoder til stamkulturfremstilling, markørverifikation og opbevaring. For hver enkelt frosset kulturpræparat påvises den aminosyrebetingede vækst (histidin for S. typhimurium-stammer og tryptophan for E. coli-stammer). Andre fænotypiske egenskaber skal kontrolleres på lignende måde, således tilstedeværende eller manglende R-faktorplasmider, når det er relevant (dvs. ampicillinresistens hos TA98-stammen, TA-100- og TA97a- eller TA97-stammen, WP2 uvrA-stammen og WP2 uvrA (pKM101)-stammen, samt ampicillin- og tetracyclinresistens hos TA102-stammen), tilstedeværelse af karakteristiske mutationer (dvs. rfa-mutation hos S. typhimurium ved hjælp af følsomhed over for krystalviolet og uvrA-mutation hos E. coli eller uvrB-mutation hos S. typhimurium ved hjælp af følsomhed over for ultraviolet lys) (2) (3). Stammerne skal ligeledes give kimtal for spontane revertanter inden for den hyppighed, der må forventes ud fra laboratoriets hidtidige kontroldata, og helst inden for den hyppighed, der er angivet i litteraturen.

1.5.1.2. *Substrat*

Der benyttes en egnet minimalager (f.eks. med Vogel-Bonner minimalsubstrat E og glucose) og en topagar med histidin og biotin eller tryptophan, så der tillades nogle få celledelinger (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolismeaktivering*

Bakterierne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerede stoffer såsom Aroclor 1254 (1) (2) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (18) (20) (21). Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 5-30% (v/v) i S9-blandingen. Valg af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration. For azofarvestoffer og diazoforbindelser kan et reduktivt metabolismeaktiveringssystem være mere velegnet (6) (13).

1.5.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af bakterierne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof skal være kompatibel med bakteriernes overlevelse og S9-aktiviteten (22). Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie.

1.5.2. **Testbetingelser**

1.5.2.1. *Teststammer* (se punkt 1.5.1.1)

1.5.2.2. *Eksponeringskoncentration*

Stoffets cytotoksicitet og dets opløselighed i den endelige testblanding er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme toksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg. Cytotoksicitet kan påvises ved et fald i antallet af revertantkolonier, ved en opklaring eller hæmning af baggrundsvæksten eller ved graden af overlevelse i de behandlede kulturer. Et stofs cytotoksicitet kan ændres ved, at der er metabolismeaktiveringssystemer til stede. Uopløselighed bedømmes ved, at der med det blotte øje kan iagttages udfældning i slutblandingen under de faktiske forsøgsbetingelser.

Der anbefales en maksimal testkoncentration af opløselige ikke-cytotoksiske stoffer på 5 mg/plade eller 5 µl/plade. For ikke-cytotoksiske stoffer, der ikke er opløselige med 5 mg/plade eller 5 µl/plade, skal en eller flere af de undersøgte koncentrationer være uopløselig i slutblandingen. Teststoffer, der er cytotoksiske allerede under 5 mg/plade eller 5 µl/plade, testes op til den cytotoksiske koncentration. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

Der benyttes mindst fem forskellige analyserbare koncentrationer af teststoffer med en afstand på ca. en halv logaritme (≈ 10) mellem koncentrationerne i det indledende forsøg. Ved undersøgelse af en koncentration/respons-sammenhæng kan mindre intervaller være hensigtsmæssigt. Test ved koncentrationer over 5 mg/plade eller 5 µl/plade kan tages under overvejelse, når bedømmelsen vedrører stoffer med et betydeligt indhold af potentielt mutagene urenheder.

1.5.2.3. *Negative og positive kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) stammespecifikke kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Der vælges en sådan koncentration i den positive kontrol, at det enkelte forsøg effektivitet godtgøres.

Ved forsøg med metabolismeaktivering udvælges positive kontrolreferencestoffer ud fra den valgte type bakteriestamme.

Nedenfor er der eksempler på stoffer, som er egnede som positive kontrolstoffer i forsøg med metabolismeaktivering:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
9,10-dimethylanthracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenz[a]anthracen	57-97-6	200-359-5
benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
2-aminoanthracen	613-13-8	210-330-9
cyclophosphamid cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Følgende stof er egnet som positivt kontrolstof ved reduktiv metabolismeaktivering:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Congo-rødt	573-58-0	209-358-4

2-aminoanthracen bør ikke anvendes som eneste indikator for, om S9-blandingen er effektiv. Hvis der benyttes 2-aminoanthracen, skal hver batch af S9 tillige karakteriseres med et mutagen, der kræver metabolismeaktivering med mikrosomenzymer, f.eks. benzo[a]pyren eller dimethylbenzanthracen.

Nedenfor er der eksempler på stoffer til brug som stammespecifikke positive kontrolstoffer i forsøg uden exogen metabolismeaktivering:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.	Stamme
natriumazid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 og TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 og TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 og TA 97a
cumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA og TA 102
N-ethyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
4-nitroquinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
furylfuramid (AF2)	3688-53-7		plasmidholdige stammer

Der kan benyttes andre egnede referencestoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, der kun består af opløsningsmiddel eller bærestof uden teststof, og som behandles på samme måde som de øvrige testgrupper. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5.3. Fremgangsmåde

Ved pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4) uden metabolismeaktivering blandes normalt 0,05 ml eller 0,1 ml testopløsning, 0,1 ml frisk bakteriekultur (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og 0,5 ml steril buffer med 2,0 ml topagar. Ved forsøg med metabolismeaktivering blandes normalt ca. 0,5 ml metabolismeaktiveringsblanding, indeholdende en passende mængde postmitokondriefraktion (5-30 % (v/v) i metabolismeaktiveringsblandingen), med topagaren (2,0 ml), bakterierne og teststoffet/testopløsningen. Indholdet i de enkelte glas blandes og hældes ud over overfladen på en minimalagarplade. Topagaren henstilles til størkning inden inkubering.

Ved præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) forinkuberes teststof/testopløsning sammen med teststammen (indeholdende ca. 10^8 levedygtige celler) og steril buffer eller metabolismeaktiveringssystemet (0,5 ml) normalt i 20 minutter ved 30-37 °C, inden der blandes med topagaren, og blandingen hældes ud på overfladen af en minimalagarplade. Normalt blandes 0,05 ml eller 0,1 ml teststof/testopløsning, 0,1 ml bakteriekultur og 0,5 ml S9-blanding eller steril buffer med 2,0 ml topagar. Glassene bør under forinkuberingen beluftes i rysteapparat.

Til forsvarlig bestemmelse af variationen udføres der tredobbelt udpladning ved hvert dosisniveau. Dobbelt udpladning kan accepteres, hvis den begrundes sagligt. Tab af en plade af og til gør ikke nødvendigvis testen ubrugelig.

Gasformige og flyttige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubering**

Alle plader i hvert forsøg inkuberes ved 37 °C i 48-72 timer. Efter inkuberingen tælles antallet af revertantkolonier pr. plade.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene forelægges som antallet af revertantkolonier pr. plade. Også antallet af revertantkolonier på både negative (opløsningsmiddelkontrol og en eventuel ubehandlet kontrol) og positive kontrolplader oplyses. Tallene for hver enkelt plade, gennemsnittet af revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen opgives for teststoffet og for positive og negative kontrolplader (ubehandlede og/eller med opløsningsmiddel).

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning, behandlingsmetoden (pladeinkorporering eller væske-præinkubation) og metabolismeaktiveringen.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade i det undersøgte interval og/eller en reproducerbar forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade ved en eller flere koncentrationer, for mindst én stamme med eller uden metabolismeaktivering (23). Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (24). Statistisk signifikans bør dog ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en tilbagemutationstest med bakterier viser, at teststoffet fremkalder punktmutationer ved basesubstitution eller læserammeforskydning i genomet hos Salmonella typhimurium og/eller Escherichia coli. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke er mutagent i den undersøge organisme.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Stammer:

— anvendte stammer

— antal celler pr. kultur

— karakteristika for stammen

Testbetingelser:

— mængde teststof pr. plade (mg/plade eller µl/plade) med begrundelse for valg af dosis og pladeantal pr. koncentration

— anvendte substrater

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— behandlingsmetoder

Resultater:

— tegn på toksicitet

— tegn på udfældning

— kimtal for de enkelte plader

— gennemsnitligt antal revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENSER

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, *113*, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, *168*, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, *1*, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part I Revised* , ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, *8*, pp. 167-177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, *38*, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures* , 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, *307*, pp. 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, *136*, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, *19*, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, *in Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, *9*, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium*, *Cancer Res.*, *39*, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *77*, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254–induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, *7*, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, *88*, pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, *189*, pp. 83-91.

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B.15 MUTAGENICITETSTESTNING OG SCREENING FOR KARCINOGENICITET

GENMUTATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

En række forskellige haploide og diploide stammer af gæren Saccharomyces cerevisiae kan anvendes ved undersøgelse af genmutationer, som induceres af kemiske stoffer med og uden metabolisk aktivering.

Man har anvendt fremadmutationssystemer med haploide stammer f.eks. ved bestemmelse af mutation fra røde, adeninafhængige mutanter (ade-1, ade-2) til dobbelt adeninafhængige hvide mutanter og selektive systemer som induktion af canavanin-resistens og cycloheximid-resistens.

Det bedst validerede tilbagemutationssystem bygger på anvendelse af den haploide stamme XV 185-14C, der er bærer af ochre nonsensemutationerne ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 og trp 5-48, og som muterer tilbage med baseparsubstitutionsmutagener, der inducerer punktmutationer eller ochre suppressormutationer. XV 185-14C er også bærer af his 1-7 markøren, som er en missense-mutation, der hovedsagelig muterer tilbage ved mutationer i andre loci, og markøren hom 3-10, der muterer tilbage med frameshift-mutagener.

Den eneste bredt anvendte diploide stamme af S. cerevisiae er D_7, der er homozygot i ilv 1-92.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Opløsninger af teststof og kontrol fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende vehikel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2 % v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i cellevitalitet og vækstkarakteristika.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiveringssystem.

Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlede med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, post-mitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

Forsøgsbetingelser

Teststammer

Den haploide stamme XV 185-14C og den diploide stamme D_7 er de hyppigst anvendte i genmutationsundersøgelser. Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og antal mutanter anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10 %. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra stof til stof.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30° C i mørke.

Spontane mutationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mutationsfrekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved genmutation, og af cellernes levedygtighed. Når man tester markører, der som hom 3-10 har en lav mutationsfrekvens, må antallet af plader forøges, således at der kan tilvejebringes en statistisk relevant mængde data.

Fremgangsmåde

Stammer af S.cerevisiae eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationærfase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase. $1—5 \times 10^7$ celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37° C under omrystning. Hvis det er nødvendigt, tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem under eksponeringen. Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af genmutationer og antal overlevende på hver plade. Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationærfase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelsesfrekvens samt mutationsfrekvens angives. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte stamme

— forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem

— eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller

— antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelses- og mutationsfrekvens, om muligt dosis-responsforhold, statistisk evaluering af data

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Der kan hos Saccharomyces cerevisiae konstateres mitotisk rekombination mellem gener (eller mere generelt mellem et gen og dets centromer) og inden for det samme gen. Den førstnævnte form kaldes mitotisk overkrydsning og frembringer reciprokke typer, mens den sidstnævnte som oftest ikke er reciprok og kaldes genbytning. Overkrydsning bestemmes almindeligvis ved frembringelse af recessive homozygote kolonier eller sektorer i en heterozygot stamme, mens genbytning bestemmes ved frembringelse af prototrofe revertanter i en auxotrof heteroallel stamme, som bærer to forskellige, defekte alleler af det samme gen. De hyppigst anvendte stammer ved undersøgelse af mitotisk genbytning er D_4 (med heteroallele ade 2 og trp 5), BZ_{34} (med heteroallel arg 4), D_7 (med heteroallel trp 5) og JD_1 (med heteroallele his 4 og trp 5). Mitotisk overkrydsning, som frembringer røde og lyserøde sektorer, kan undersøges i D_5 og D_7 (der også kan bruges til bestemmelse af mitotisk genbytning og tilbagemutation af ilv 1-92), idet begge stammer bærer heteroallele komplementære alleler til ade 2.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Opløsninger af teststof og kontrol- eller referencestoffer fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende opløsningsmiddel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2 % v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i cellevitalitet og vækstkarakteristika.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststof både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiveringssystem.

Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlede med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, postmitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

Forsøgsbetingelser

Teststammer

De hyppigst anvendte stammer er de diploide D_4, D_5, D_7 og JD_1. Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og mitotisk rekombinationsfrekvens anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Herunder må man tage hensyn til faktorer som cytotoksicitet og opløselighed. De laveste koncentrationer bør ikke have nogen indvirkning på cellernes levedygtighed. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10 %. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler i stationær fase eller vækstfase kan eksponeres for teststoffet i op til 18 timer. Benyttes der lange eksponeringsperioder, bør kulturerne dog undersøges mikroskopisk for sporedannelse, idet disses tilstedeværelse gør testen værdiløs.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30° C i mørke. Plader, som anvendes til bestemmelse af røde og lyserøde homozygote sektorer, der er frembragt ved mitotisk overkrydsning, opbevares i køleskab (omkring 4° C) i yderligere en til to dage inden optælling for at muliggøre udvikling af de rette pigmenterede kolonier.

Spontane mitotiske rekombinationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mitotiske frekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved mitotisk genbytning, og af cellernes levedygtighed. Når man tester recessive homozygoter, som er frembragt ved mitotisk overkrydsning, forøges antallet af plader, således at der opnås et passende antal kolonier.

Fremgangsmåde

Stammer af S.cerevisiae eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationær fase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase. $1—5 \times 10^7$ celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37° C under omrystning. Under eksponeringen tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af mitotisk rekombination og antal overlevende på hver plade. Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationær fase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelsesgrad samt rekombinationsfrekvens angives. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte stamme

— forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem

— eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller

— antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelses- og rekombinationsfrekvens, om muligt dosis-responsforhold, statistisk evaluering af data

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

»B.17. MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 476 »In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

In vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan benyttes til at påvise genmutationer, som induceres af kemiske stoffer. Blandt egnede cellelinjer er muselymfomceller L5178Y, cellelinjerne CHO, CHO-AS52 og V79 fra kinesisk hamster og humane lymfoblastceller TK6 (1). I disse cellelinjer benyttes som genetiske endpoints almindeligvis bestemmelse af mutationer ved thymidin-kinase (TK), hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferase (HPRT) og et transgen af xanthin-guanin-fosforibosyl-transferase (XPRT). I TK-, HPRT- og XPRT-mutationstestene påvises forskellige spektre af genetiske hændelser. Med TK og XPRT kan der på grund af deres autosomale placering påvises genetiske hændelser (f.x. større deletioner), der ikke kan påvises ved HPRT-locus'et på X-kromosomer (2) (3) (4) (5) (6).

I in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer eller cellestammer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning og den spontane mutationsfrekvens's stabilitet.

Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en exogen metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændigt efterligne forholdene i pattedyr in vivo. Man må omhyggeligt undgå forhold, der fører til resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet. Positive resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet, kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoksicitet (7).

Testen benyttes til screening for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der er positive ved denne test, er carcinogene hos pattedyr, men korrelationen mellem denne test og carcinogenicitet er ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og stadig mere tyder på, at der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de tilsyneladende virker gennem andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller (6).

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Fremadmutation: En genmutation fra forældretypen til mutanten, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet.

Basesubstitutionsmutagen: Et stof, der fremkalder substitution af et eller flere DNA-basepar.

Læserammemutagen: Et stof, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

Fænotypeekspressionsperiode: Et tidsrum, hvorunder uændrede genprodukter gradvis forsvinder fra nylig muterede celler.

Mutanthyppighed: Antallet af observerede mutantceller divideret med antallet af levedygtige celler.

Relativ total vækst: Forøgelsen af celleantallet i et tidsrum, sammenlignet med en kontrolpopulation af celler; beregnes som produktet af suspensionsvæksten i forhold til den negative kontrol og klondannelseseffektiviteten i forhold til den negative kontrol.

Relativ suspensionsvækst: Forøgelsen af celleantallet i ekspressionsperioden i forhold til den negative kontrol.

Levedygtighed: De behandlede cellers klondannelseseffektivitet på tidspunktet for selektiv udpladning efter ekspressionsperioden.

Overlevelse: De behandlede cellers klondannelseseffektivitet ved udpladningen efter behandlingsperioden; overlevelsen udtrykkes normalt i forhold til overlevelsen i kontrolcellepopulationen.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Celler, som mangler thymidin-kinase TK på grund af fremadmutationen $TK^{+/+} \rightarrow TK^{-/-}$, er resistente over for de cytotoksiske virkninger af pyridinanalogen trifluorthymidin (TFT). Celler, som har thymidin-kinase, er følsomme over for TFT, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TFT, mens normale celler, der indeholder thymidin-kinase, ikke kan. På tilsvarende måde kan celler, der mangler HPRT eller XPRT, udvælges ved deres modstandsdygtighed over for henholdsvis 6-thioguanin (TG) og 8-azaguanin (AG). Hvis der i en af genmutationstestene med pattedyrceller testes et stof, der er baseanalogt med det selektive stof eller beslægtet hermed, må der først ses nøje på teststoffets egenskaber. Eksempelvis bør enhver mistanke om, at teststoffet har selektiv toksicitet over for mutantceller og ikke-mutantceller, undersøges. Det vil sige, at det selektive system/stofs egnethed skal bekræftes, når der testes stoffer, der kemisk er beslægtet med det selektive stof (8).

Celler i suspensionskultur eller enkeltlagskultur udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i et passende tidsrum, hvorefter der ved dyrkning i subkultur påvises cytotoksicitet og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoksiciteten bestemmes sædvanligvis ved at måle kulturernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller deres relative totale vækst efter behandlingsperioden. De behandlede kulturer holdes så lang tid i vækstmediet, afhængigt af hvert valgt locus og celletype, at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal. Mutanthyppigheden bestemmes ved udsåning af et kendt antal celler i et medium, der indeholder det selektive stof, til påvisning af mutantceller og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af klondannelseseffektiviteten (levedygtigheden). Efter en passende inkuberingstid tælles kolonierne. Mutanthyppigheden afledes af antallet af mutantkolonier i det selektive medium og antallet af kolonier i det ikke-selektive medium.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Celler*

En lang række cellelinjer lader sig anvende i denne test, herunder subkloner af L5178Y, CHO, CHO-AS52, V-79 og TK6-celler. For de celletyper, der benyttes i denne test, bør der være påvist følsomhed over for kemiske mutagener, høj klondannelseseffektivitet og stabil spontan mutationshyppighed. Cellerne bør kontrolleres for forurening med mycoplasma og bør ikke anvendes, hvis de er forurenet.

Testen bør tilrettelægges med forud fastlagt følsomhed og styrke. Antallet af celler, kulturer og koncentrationer af teststof bør afspejle disse valgte parametre (14). Det mindste antal levedygtige celler, der overlever behandling og benyttes i testens faser, baseres på den spontane mutationshyppighed. Som rettesnor kan der anvendes et celleantal, der er mindst ti gange den reciprokke spontane mutationshyppighed. Det anbefales dog, at der mindst anvendes 10^6 celler. Der skal foreligge tilstrækkelige historiske data om cellesystemet til at dokumentere, at testen har konstant høj effektivitet.

1.4.1.2. *Medier og dyrkningsbetingelser*

Der benyttes egnede dyrkningsmedier og inkuberingsbetingelser (dyrkningsbeholdere, temperatur, CO_2-koncentration, luftfugtighed). Medier vælges efter, hvilke selektive systemer og celletyper der benyttes i testen. Det er især vigtigt at vælge sådanne dyrkningsbetingelser, at både mutantcellers og ikke-mutantcellers vækst og kolonidannelse bliver optimal under ekspressionsperioden.

1.4.1.3. *Fremstilling af kulturer*

Cellerne opformeres fra stamkulturer, udsås i dyrkningsmedium og inkuberes ved 37 °C. Det kan være nødvendigt at rense kulturerne for allerede-eksisterende mutanter, inden de benyttes i denne test.

1.4.1.4. *Metabolismeaktivering*

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (19) (20).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10 % (v/v) i det færdige testsubstrat. Valget af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i vækseform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. Testbetingelser

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmiddel/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes ved tilsætning af molekylsi.

1.4.2.2. *Eksponeringskoncentrationer*

Stoffets cytotoksicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoksiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. relativ klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relativ total vækst. Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

Der benyttes mindst fire analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytotoksicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højst er adskilt med en faktor mellem 2 og √10. Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoksicitet, bør den føre til en relativ overlevelse (relativ klondannelseseffektivitet) eller relativ total vækst på ca. 10-20 % (ikke under 10 %). For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoksiske, må testkoncentrationen højst være 5 µl/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

Forholdsvis uopløselige stoffer testes op til eller over opløselighedsgrænsen ved dyrkningsbetingelserne. Tegn på uopløselighed bør konstateres i det endelige behandlingsmedium, som cellerne udsættes for. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler, S9, serum mv. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3. *Kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer.

Metabolismeaktivering	Locus	Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Ingen exogen metabolismeaktivering	HPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (små og store kolonier)	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Exogen metabolismeaktivering	HPRT	3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimethylbenzanthracen	57-97-6	200-359-5
	TK (små og store kolonier)	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
		Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
		Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	*N*-nitrosodimethylamin (ved højt indhold af S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyrene	50-32-8	200-028-5

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol, f.eks. kan et laboratorium, der har en historisk database over 5-brom-2'-deoxyuridin (CAS nr. 59-14-3, Einecs nr. 200-415-9), også benytte dette referencestof. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærestof, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3. **Fremgangsmåde**

1.4.3.1. *Behandling med teststof*

Celler under formering udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Eksponeringen skal vare en passende tid (normalt har tre-fem timer den fornødne virkning). Eksponeringen kan strække sig over én eller flere cellecyklusser.

Ved hver undersøgt koncentration benyttes der enten en eller to behandlede kulturer. Benyttes der kun én kultur, øges antallet af koncentrationer, således at der bliver tilstrækkeligt mange kulturer til analyse (dvs. mindst otte analyserbare koncentrationer). Der bør anvendes to negative kontrolkulturer (opløsningsmiddel).

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (21) (22).

1.4.3.2. *Måling af overlevelse, levedygtighed og mutanthyppighed*

Efter eksponeringen vaskes cellerne og dyrkes med henblik på at bestemme overlevelsen og give mulighed for ekspression af mutantfænotypen. Måling af cytotoksicitet ved bestemmelse af kulturernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relative totale vækst påbegyndes normalt efter behandlingsperioden.

Hvert locus har et fast mindste tidsrum, som kræves til nær optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede mutanter (HPRT og XPRT kræver mindst seks-otte dage og TK mindst to dage). Cellerne dyrkes i medier med og uden selektivt stof med henblik på bestemmelse af henholdsvis antallet af mutanter og klondannelseseffektiviteten. Måling af levedygtigheden (der benyttes til beregning af mutanthyppigheden) påbegyndes efter ekspressionstiden ved udpladning på ikke-selektivt medium.

Hvis teststoffet reagerer positivt i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bestemmes kolonistørrelsen i mindst en af testkulturerne (den højeste positive koncentration) og i de positive og negative kontrolkulturer. Hvis teststoffet reagerer negativt i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bestemmes kolonistørrelsen i de positive og negative kontrolkulturer. Også ved undersøgelser med TK6$TK^{+/-}$ kan kolonistørrelsen bestemmes.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene skal omfatte bestemmelse af cytotoksicitet og levedygtighed, kimtælling og mutanthyppighed for de behandlede kulturer og kontrolkulturerne. I tilfælde af positiv reaktion i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bedømmes kolonierne ud fra kriterier om små og store kolonier ved mindst én koncentration af teststoffet (højeste positive koncentration) og med den negative og positive kontrol. Den molekylære og cytogenetiske natur af mutanter i både store og små kolonier er udforsket detaljeret (23) (24). I $TK^{+/-}$-testen bedømmes kolonierne efter kriterier for normalt voksende (store) og langsomt voksende (små) kolonier (25). De mutantceller, der har de mest alvorlige genetiske skader, har længere fordoblingstider og danner derfor mindre kolonier. Sådanne skader ligger typisk fra tab af hele genet til karyotypisk synlige kromosomaberrationer. Induktion af mutanter i små kolonier har været tilskrevet kemikalier, der fremkalder kromosomaberrationer, der kan ses med det blotte øje (26). Mindre alvorligt berørte mutantceller vokser med omtrent samme hastighed som modercellerne og danner store kolonier.

Overlevelsen (den relative klondannelseseffektivitet) eller den relative totale vækst skal oplyses. Mutanthyppigheden opgives som antallet af mutantceller i forhold til antallet af overlevende celler.

Der anføres data for hver enkelt kultur. Derudover sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendigt, skal dette begrundes. Ved forsøg til opfølgning af tvetydige eller negative resultater bør man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktiveringen.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig eller reproducerbar forøgelse af mutanthyppigheden. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for genmutation i pattedyrceller viser, at teststoffet fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller. En positiv koncentrationsafhængig reproducerbar respons er mest sigende. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes.

Celler:

— celletype og -kilde

— antal cellekulturer

— eventuelt antal passager

— eventuelle metoder til vedligehold af cellekultur

— fravær af mycoplasma

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— substratsammensætning og eventuel CO_2-koncentration

— teststoffets koncentration

— volumen af tilsat bærestof og teststof

— inkuberingstemperatur

— inkuberingstid

— behandlingens varighed

— celletæthed under behandlingen

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— positive og negative kontrolprøver

— ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)

— selektive agenser

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

— metoder til tælling af levedygtige celler og mutantceller

— definition af kolonier, hvor størrelse og type lægges til grund (herunder kriterier for, hvilke kolonier der er »små« og »store«)

Resultater:

— tegn på toksicitet

— tegn på udfældning

— data om pH og osmolalitet under udsættelsen for teststoffet, hvis disse værdier er målt

— kolonistørrelse, hvis den er bedømt, i hvert fald for negative og positive kontrolkulturer

— laboratoriets kapacitet til at påvise mutanter i små kolonier med L5178Y $TK^{+/-}$-systemet

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— mutanthyppighed

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

(1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61*, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, pp. 467-485.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394-403.

(5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, *223*, pp. 121-128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, *312*, pp. 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, *257*, pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, *115*, pp. 225-251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, *196*, pp. 17-36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res., 189*, pp. 135-141.

(11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res., 216*, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res., 160*, pp. 133-147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ - $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res., 46*, pp. 365-373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res., 31*, pp. 347-364.

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res., 59*, pp. 61-108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res., 113*, pp. 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7*, pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87*, pp. 51-55.

(24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res. 151*, pp. 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res., 229*, pp. 89-102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/$TK^{+/-}$ - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis 5*, pp. 609-614.

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved Unscheduled DNA Synthesis (UDS) test undersøges DNA-reparationen efter bortskæring og fjernelse af skader, som er induceret af kemiske eller fysiske agentia. Testen bygger på inkorporering af tritiummærket thymidin (^{3}H-TdR) i pattedyrcellers DNA, når disse celler ikke er i S-fase. Optagelsen af ^{3}H-TdR kan måles ved autoradiografi eller væskescintillationstælling (LSC) af DNA fra de eksponerede celler. Medmindre der anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, eksponeres dyrkede pattedyrceller for teststoffet med og uden et eksogen metabolisk aktiveringssystem. UDS-test kan også foretages i in vivo-systemer.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststof samt kontrol- og referencestoffer tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i egnede vehikler og tilsættes derefter kulturmediet inden testen. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed. Der kan anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, humane lymfocytter eller etablerede cellelinjer (f.eks. humane diploide fibroblaster).

Cellerne eksponeres for teststoffet med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

Forsøgsbetingelser

Antal kulturer

Ved autoradiografisk påvisning af UDS anvendes mindst to og ved LSC seks kulturer (eller mindre hvis det er videnskabeligt begrundet) for hvert eksperimentelt punkt.

Negative og positive kontroller

Der foretages sideløbende både positiv og negativ (ubehandlet og/eller vehikel) kontrol med og uden metabolisk aktivering i hvert forsøg.

Som positiv kontrol ved anvendelse af rottehepatocytter kan f.eks. benyttes 7,12-DMBA (7,12-dimetylbenzanthracen) eller 2-AAF (2-acetylaminofluoren). Som positiv kontrol ved anvendelse af etablerede cellelinjer kan f.eks. benyttes 4-NQO (4-nitroquinolin-N-oxid) både i forbindelse med autoradiografisk registrering og LSC uden metabolisk aktivering. Når der anvendes metaboliske aktiveringssystemer kan f.eks. N-dimetylnitrosamin benyttes til positiv kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet over et interval, som dækker alle påvirkninger. Den højeste koncentration bør have en vis cytotoksisk virkning. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes op til opløselighedsgrænsen.

Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler

Der benyttes passende vækstmedier, CO_2-koncentration, temperatur og fugtighed til opretholdelse af kulturerne. Det undersøges regelmæssigt om etablerede cellelinjer er kontamineret med mycoplasma.

Metabolisk aktivering

Der anvendes ikke metaboliske aktiveringssystemer i forbindelse med primærkulturer af hepatocytter.

Etablerede cellelinjer og lymfocytter eksponeres for teststoffer både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

Fremgangsmåde

Forberedelse af kulturer

Etablerede cellelinjer fremstilles på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrystning) og udsås med passende tæthed i dyrkningsskåle, hvorefter de inkuberes ved 37° C.

Primære rottehepatocytkulturer etableres, når hepatocytter umiddelbart efter isolering anbringes i et passende medium og får lov til at hæfte sig til den voksende overflade.

Humane lymfocytkulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker.

Eksponering af kulturerne for teststoffet

Primærkulturer af rottehepatocytter

Rottehepatocytter eksponeres for teststoffet kort tid efter isolering i et passende tidsrum i et medium, som indeholder ^{3}H-TdR. Efter eksponeringen fjernes cellerne fra mediet, hvorefter de vaskes, fikseres og tørres.

Pladerne dyppes i en autoradiografisk emulsion (alternativt kan »stripping« film anvendes) og eksponeres, fremkaldes, farves og tælles.

Etablerede cellelinjer og lymfocytter

Autoradiografisk teknik: Cellekulturerne eksponeres først for teststoffet i et passende tidsrum og derefter for ^{3}H-TdR. Eksponeringsperioderne afhænger af stofferne, de metaboliske aktiveringssystemer og celletyperne. Eksponeringen for ^{3}H-TdR bør enten foregå samtidig med eksponeringen for teststoffet eller få minutter efter, således at UDS måles på det tidspunkt, hvor aktiviteten er størst.

Valget mellem de to fremgangsmåder afhænger af risikoen for interaktion mellem teststoffet og ^{3}H-TdR.

Det er muligt at skelne mellem UDS og semi-konservativ DNA replication, idet den sidstnævnte proces inhiberes ved anvendelse af f.eks. argininfattige medier, et lavt serumindhold eller tilsætning af hydroxyurinstof til kulturmediet.

LSC-måling af UDS: Inden eksponering for teststoffet blokeres cellernes overgang til S-fasen som tidligere beskrevet. Derefter eksponeres cellerne på samme måde som ved den autoradiografiske teknik. Umiddelbart efter inkubationen ekstraheres cellernes DNA og det totale DNA-indhold samt mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR måles.

Når de nævnte teknikker anvendes på humane lymfocytter, er det unødvendigt at hæmme den semi-konservative DNA replication, med mindre der er tale om stimulerede kulturer.

Analyse

Autoradiografisk måling

Ved måling af UDS i dyrkede celler medregnes kerner i S-fasen ikke. Der tælles mindst 50 celler pr. koncentration. Objektglassene kodes før tællingen. På hvert glas tælles en række forskellige tilfældigt valgte områder med stor indbyrdes afstand. Mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR i cytoplasmaet bestemmes ved tælling i tre områder på størrelse med kernen i hver optalt celles cytoplasma.

LSC-måling

Ved LSC-måling af UDS anvendes et passende antal kulturer pr. koncentration og pr. kontrolforsøg. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform.

2.1. Autoradiografisk måling

Mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR i cytoplasmaet og antallet af korn, som registreres i cellekerneområdet, anføres separat. Fordelingen af mængden af inkorporeret ^{3}H-TdR i cytoplasmaet og antallet af korn pr. kerne kan beskrives ved hjælp af middel, median og modus.

2.2. LSC-måling

Ved LSC-måling angives ^{3}H-TdR indlejringen som dpm/µg DNA. Indlejringsfordelingen kan beskrives ved hjælp af middel dpm/µg DNA med tilhørende standardafgivelse. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte celler, tæthed og antal passager på eksponeringstidspunktet, antal cellekulturer

— metoder til opretholdelse af cellekulturer, herunder medium, temperatur og CO_2-koncentration

— teststof, vehikel, koncentrationer og begrundelse for valget af de anvendte koncentrationer

— detaljerede oplysninger om de metaboliske aktiveringssystemer

— eksponeringsplan

— positiv og negativ kontrol

— den anvendte autoradiografiske teknik

— fremgangsmåde ved blokering af cellernes overgang til S-fasen

— fremgangsmåde ved ekstration af DNA og bestemmelse af det totale DNA-indhold ved LSC-målingen

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.19 SØSTERKROMATID OMBYTNING (SCE) IN VITRO

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Søsterkromatid ombytning (SCE) test er en korttidstest, som anvendes til påvisning af reciprok udveksling af DNA mellem de to søsterkromatider i et kromosom under replikation. Ved SCE sker der en udveksling af DNA replikationsprodukter ved tilsyneladende homologe loci. Udvekslingsprocessen bygger antageligt på brud og genforening af DNA-kæder, men dens molekylære grundlag er næsten ukendt. For at kunne påvise SCE er det nødvendigt at differentialmærke søsterkromatiderne, hvilket kan gøres ved at inkorporere bromdeoxyuridin (BrdU) i kromosomernes DNA gennem to cellecykler.

Pattedyrceller eksponeres in vitro for teststoffet med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr, hvis dette skønnes relevant, og dyrkes gennem to cellecykler i et medium, som indholder BrdU. Cellerne behandles med en tentrådsinhibitor (f.eks. colchicin) med henblik på at akkumulere celler på et metafaselignende trin i mitosen (c-metafase), hvorefter de høstes og præpareres til kromosomanalyse.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

— Der kan anvendes primærkulturer (humane lymfocytter) eller etablerede cellelinjer (f.eks. Chinese Hamster Ovary celler). Ved anvendelse af cellelinjer bør det undersøges, om kulturen er kontamineret med mycoplasma.

— Der anvendes egnede kulturmedier og inkubationsbetingelser (temperatur, dyrkningsskåle, CO_2-koncentration og fugtighed).

— Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede koncentration af vehikel i testkulturen bør ikke påvirke cellernes levedygtighed eller vækstrate og en mulig påvirkning af SCE-frekvensen kontrolleres ved dyrkning af en kontrolkultur i opløsningsmidlet.

— Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celletyper med endogen metabolisk aktivering, bør aktiveringsform og -hastighed være egnet til den kemiske stofklasse, der testes.

Forsøgsbetingelser

Antal kulturer

Der anvendes mindst to parallelle kulturer for hvert eksperimentelt punkt.

Positiv og negativ kontrol

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages vehikelkontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

— direkte virkende forbindelse: ætylmetansulfonat

— indirekte virkende forbindelse: cyclofosfamid.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en kemisk forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst tre koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Den højeste koncentration bør have en tydelig toksisk virkning, men den må ikke forhindre den nødvendige celledeling. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Fremgangsmåde

Dyrkning

Cellelinjer etableres på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrystning) og udsås med passende tæthed i dyrkningsskåle, hvorefter de inkuberes ved 37° C. Når der er tale om monolagskulturer, justeres antallet af celler pr. kulturskål, således at kulturerne på høsttidspunktet højst dækker 50 % af vækstarealet. Cellerne kan også dyrkes i suspension. Humane lymfocytkulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker på basis af hepariniseret blod og inkuberes ved 37° C.

Eksponering

Celler i eksponentiel vækstfase eksponeres for teststoffet i et passende tidsrum. Som oftest vil en eller to timer være tilstrækkeligt, men i nogle tilfælde kan eksponeringsperioden udvides til at dække to fulde cellecykler. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, eksponeres både med og uden tilsætning af et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof og dyrkes gennem to cellecykler i et medium, som indeholder BrdU. Alternativt kan cellerne eksponeres for teststoffet og BrdU samtidigt gennem en periode svarende til to cellecykler. Humane lymfocytter eksponeres, mens de befinder sig i semisynkron tilstand. Cellerne analyseres under deres anden deling efter eksponeringen, hvilket sikrer, at eksponeringsperioden dækker størstedelen af de følsomme faser i cellecyclus. Alle kulturer, som er tilsat BrdU, opbevares og manipuleres i mørke eller svagt lys fra glødelamper frem til cellerne høstes for at minimere fotolysen af DNA, som indeholder BrdU.

Høst af celler

Cellekulturerne behandles med en tentrådsinhibitor (f.eks. colchicin) en til fire timer, før de høstes. Høst og kromosompræparering foregår særskilt for hver enkelt kultur.

Kromosompræparering og farvning

Ved kromosompræpareringen anvendes cytogenetiske standardteknikker. Farvning på objektglas med henblik på at påvise SCE kan foretages på en række forskellige måder (f.eks. fluorescens plus Giemsafarvning).

Analyse

Antallet af celler, som underkastes analyse, baseres på den spontane SCE-frekvens i kontrolforsøg. Normalt undersøges mindst 25 velpræparerede metafaser pr. kultur for SCE. Objektglassene kodes før analysen.

Ved analyse af humane lymfocytter medtages kun metafaser med 46 centromerer. Ved analyse af etablerede cellelinjer medtages kun metafaser med det modale antal centromerer ± 2. Det anføres, hvorvidt ombytning i mærkningen omkring centromeret betragtes som SCE. Resultaterne efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal SCE pr. metafase og antal SCE pr. kromosom anføres separat for alle eksponerede kulturer og kontrolkulturer. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte celler, metoder til opretholdelse af cellekulturer

— forsøgsbetingelser: mediernes sammensætning, CO_2-koncentration, teststofkoncentration, det anvendte vehikel, inkubationstemperatur, eksponeringsperiode, den anvendte tentrådsinhibitor plus oplysninger om koncentration og behandlingens varighed, det anvendte metaboliske aktiveringssystem, positiv og negativ kontrol

— antal cellekulturer pr. eksperimentelt punkt

— detaljerede oplysninger om objektpræpareringsteknikken

— antal analyserede metafaser (separate oplysninger for hver enkelt kultur)

— gennemsnitligt antal SCE pr. celle og pr. kromosom (data angives separat for hver kultur)

— SCE-registreringskriterier

— begrundelse for valget af doser

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.20 KØNSBUNDET RECESSIV LETAL TEST — DROSOPHILA MELANOGASTER

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved kønsbundet recessiv letal test (SLRL) under anvendelse af Drosophila melanogaster undersøges forekomsten af både punktmutationer og mindre tabsmutationer hos insektets afkom. Der er tale om en fremadmutationstest, hvorved det er muligt at screene ca. 800 loci på X-kromosomet med henblik på registrering af mutationer. Dette antal udgør ca. 80 % af alle X-kromosomets loci. X-kromosomet udgør omkring en femtedel af den samlede haploide kromosommængde.

Mutationer i Drosophila melanogasters X-kromosom kommer fænotypisk til udtryk hos hanner, som er bærere af det muterede gen. Når mutationen under hemizygote betingelser er letal, konstateres dette som fravær af en af de to typer hanner, der normalt findes i en heterozygot huns afkom. I SLRL-testen udnyttes dette forhold ved hjælp af specielt arrangerede kromosomer med særlige markører.

1.5 Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Stammer

Der kan anvendes hanner af veldefinerede vildtypestammer og hunner fra Muller-5-stammen. Hunner fra andre stammer med passende mærkning og multipelt inverterede X-kromosomer kan også anvendes.

Teststof

Teststoffet opløses i vand. Stoffer, som er uopløselige i vand, kan opløses eller suspenderes i egnede bærestoffer (f.eks. en blanding af ætanol og Tween-60 eller -80) og derefter fortyndes i vand eller saltvand inden indgift. Dimetylsulfoxid bør ikke benyttes som bærestof.

Antal

Testen udformes således, at testfølsomhed og -specificitet er fastlagt på forhånd. Den spontane mutationsfrekvens, som registreres i kontrolforsøg, vil være af stor betydning for antallet af eksponerede kromosomer, der skal analyseres.

Administrationsmåde

Eksponeringen kan foregå ved oral indgivelse, injektion eller ved udsættelse for gasser eller dampe. Teststoffet kan eventuelt indgives i en sukkeropløsning. Om nødvendigt kan det opløses i en 0,7 % NaCl-opløsning og injiceres i thorax eller abdomen.

Negative og positive kontroller

Der foretages negativ (vehikel) og positiv kontrol. Hvis der foreligger egnede historiske kontroldata fra laboratorieforsøg, er det imidlertid ikke nødvendigt at foretage sideløbende kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes tre eksponeringskoncentrationer. Til en foreløbig vurdering kan anvendes en enkelt koncentration, som enten kan være den højeste koncentration, insekterne kan tåle, eller en koncentration, som forårsager nogen grad af toksisk virkning. Ved ikke-toksiske stoffer eksponeres for de størst mulige koncentrationer.

Fremgangsmåde

Vildtypehanner (tre til fem dage gamle) eksponeres for teststoffet og parres enkeltvis med flere jomfruelige hunner fra Muller-5-stammen eller fra andre stammer med passende markører (multipelt inverterede X-kromosomer). Hunnerne udskiftes med nye jomfruelige hunner hver anden eller hver tredje dag, indtil hele kønscellecyklus er dækket. Hunnernes afkom registreres med henblik på konstatering af letale effekter, som svarer til eskponeringens virkning på henholdsvis modne sædceller, spermatider i sene stadier eller middelstadier, spermatider i tidlige stadier, spermatocytter og spermatogonier. Heterozygote F_1-hunner fra de ovennævnte krydsninger parres individuelt (dvs. en hun pr. glas) med deres brødre. I F_2-generationen registreres hver bestand med henblik på konstatering af fravær af vildtypehanner. Hvis en bestand er afkom af en F_1-hun, som synes at bære et letalt gen i det parentale X-kromosom (dvs. der optræder ingen hanner med det eksponerede kromosom), testes døtre af denne hun med samme genotype med henblik på konstatering af, om den letale effekt gentages i næste generation.

2. DATA

Data opstilles i tabelform. Antal testede X-kromosomer, antal ufrugtbare hanner og antal letale kromosomer anføres for hver eksponeringskoncentration og for hver enkelt af de eksponerede hanners parringsperioder. Ligeledes anføres antal klynger af forskellig størrelse pr. han. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

Evalueringen af kønsbunden recessiv letal test baseres på passende statistiske metoder. I tilfælde af ophobning af generationer med recessive letale gener, som stammer fra en enkelt han, registreres disse og evalueres på et passende statistisk grundlag.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stammer: de anvendte Drosophila-stammer, insekternes alder, antal eksponerede hanner, antal sterile hanner, antal etablerede F_2-bestande, antal F_2-bestande uden afkom, antal kromosomer med letale gener på hvert kønscellestadium

— kriterier for fastlæggelse af størrelsen af de eksponerede grupper

— forsøgsbetingelser: detaljeret beskrivelse af eksponerings- og stikprøvetagningsplan, eksponeringskoncentrationer, toksicitetsdata, negativ (opløsningsmiddel) og positiv kontrol, såfremt der foretages kontrol

— kriterier for registrering af letale mutationer

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.21 CELLETRANSFORMATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Kulturer af pattedyrceller kan anvendes til påvisning in vitro af fænotypiske forandringer, som induceres af kemiske forbindelser, der forbindes med maligne transformationer in vivo. Hyppigt anvendte celletyper er C3H10T$^{1}/_{2}$, 3T3, SHE, Fischer-rotte, og testene bygger på forandringer i cellemorfologien, vækstevnen eller forankringsevnen i blød agar. Der findes også mindre hyppigt anvendte systemer, som bruges til undersøgelse af andre fysiologiske eller morfologiske forandringer i celler som følge af eksponering for karcinogene kemiske forbindelser. Der er ikke beskrevet nogen direkte virkningsmekanistisk forbindelse mellem cancer og de genetiske endpoints, der anvendes i disse in vitro tests. Nogle af testsystemerne kan anvendes til påvisning af tumorpromotorer. Den cytotoksiske effekt kan bestemmes ved måling af teststoffets påvirkning af evnen til at danne kolonier (kloningsstyrken) eller af kulturernes vækstrater. Formålet med at måle den cytotoksiske effekt er at konstatere, om eksponeringen for teststoffet er toksikologisk relevant, men kan ikke benyttes til beregning af transformationsfrekvensen i alle tests, eftersom nogle kræver lang inkubationstid og/eller overførsel til nye plader.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Celler

Der kan anvendes en række forskellige cellelinjer eller primærceller afhængigt af, hvilken transformationstest der foretages.

Forsøgslederen må sikre, at de anvendte celler undergår relevante fænotypiske forandringer efter eksponering for kendte karcinogener, og forsøgslederens eget laboratorium må have påvist og dokumenteret den anvendte tests validitet og pålidelighed.

Medium

Der anvendes medier og forsøgsbetingelser i overensstemmelse med den anvendte transformationstest.

Teststof

Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed, vækstrate eller transformationsfrekvens.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celler med endogen metabolisk aktivering, bør det være påvist, at aktiveringsformen egner sig til den form for kemisk forbindelse, der testes.

Forsøgsbetingelser

Positive og negative kontroller

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages negativ (vehikel) kontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

— direkte virkende forbindelser:
  — etylmetansulfonat
  — β-propiolacton
— forbindelser som kræver metabolisk aktivering:
  — 2-acetylaminofluoren
  — 4-dimetylaminoazobenzen
  — 7,12-dimetylbenzanthracen.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet, således at der frembringens koncentrationsafhængige toksiske virkninger. Den højeste koncentration bør medføre en lav overlevelsesgrad, og overlevelsesgraden ved den laveste koncentration bør være af samme størrelsesorden som ved det negative kontrolforsøg. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Fremgangsmåde

Cellerne eksponeres i en passende periode afhængig af det anvendte testsystem. Dette kan indebære gentagne doseringer med udskiftning af medium (og om nødvendigt ny metabolisk aktivering), hvis der er tale om langvarig eksponering. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, testes både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof, hvorefter de dyrkes med henblik på at lade den transformerede fænotype, testen bygger på, komme til udtryk og med henblik på bestemmelse af transformationsfrekvensen.

Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. DATA

Data opstilles i tabelform og kan foreligge i forskellige former afhængigt af den anvendte test. Der kan f.eks. være tale om optælling på plader, registrering af positive plader eller antal transformerede celler. Når det er relevant, udtrykkes overlevelsesgraden som en procentdel af overlevelsen i kontrolforsøgene, og transformationsfrekvensen udtdrykkes som antal transformerede celler pr. overlevende.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte celletype, antal cellekulturer, metoder til opretholdelse af cellekulturer

— forsøgsbetingelser: teststofkoncentration, anvendt vehikel, inkubationstemperatur, inkubationstid, eksponeringens varighed og frekvens, celletæthed under eksponeringen, det anvendte eksogene metaboliske aktiveringssystem, positiv og negativ kontroller, specifikation af den fænotype testen bygger på, det anvendte selektive system (hvis et sådant er anvendt), begrundelse for valget af doser

— metoder til registrering af levedygtige og transformerede celler

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.22 DOMINANT LETAL TEST — GNAVER

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Dominante letale virkninger forårsager, at fostret dør. Nå der ved eksponering for kemiske forbindelser induceres dominante letale mutationer, er dette et tegn på, at forsøgsdyreartens kønscellevæv er blevet afficeret. Der er bred enighed om, at dominante letale gener opstår på grund af kromosomskader (strukturelle og numeriske anomalier). Hvis eksponerede hunners afkom dør på det embryonale stade, kan dette også skyldes toksiske virkninger.

Normalt eksponeres hanner for teststoffet, hvorefter de parres med ueksponerede jomfruelige hunner. Kønscellernes forskellige stadier kan undersøges separat ved anvendelse af på hinanden følgende parringsperioder. Forøgelsen af antallet af døde implantater pr. hun i den eksponerede gruppe i forhold til antallet af døde implantater pr. hun i kontrolgruppen er udtryk for den letale virkning efter implantation. Den letale virkning før implantation kan vurderes på grundlag af optælling af corpora lutea eller ved sammenligning af det totale antal implantater pr. hun i de eksponerede grupper og kontrolgruppen. Den totale dominante letale virkning er summen af de letale virkninger før og efter implantation. Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Fald i antallet af implantater i bestemte tidsperioder kan skyldes celledrab (af spermatocytter og/eller spermatogonier).

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Hvis det er muligt, opløses eller suspenderes teststoffet i fysiologisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Det anvendte vehikel bør ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning. Testopløsningen anvendes umiddelbart efter fremstillingen.

Forsøgsbetingelser

Administrationsmåde

Normalt gives hele dosis på en gang. Der kan også anvendes dosering ad flere gange, når der er toksikologisk begrundelse herfor. Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Der kan også benyttes andre former for indgift.

Forsøgsdyr

Rotter eller mus anbefales som forsøgsdyr. Sunde og fuldt kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper.

Antal og køn

Der anvendes et passende antal hanner under hensyntagen til den spontane variation i den biologiske egenskab, der danner grundlag for testen. Det valgte antal baseres på den på forhånd fastlagte testfølsomhed og signifikansstyrke. I et typisk forsøg vil antallet af hanner være tilstrækkeligt til, at mellem 30 og 50 hunner bliver drægtige i hver parringsperiode.

Negative og positive kontroller

Normalt foretages sideløbende positiv og negativ (vehikel) kontrol i hvert forsøg. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium, kan disse dog anvendes i stedet for sideløbende positiv kontrol.

Positive kontrolstoffer anvendes i tilstrækkeligt lave doser (f.eks. MMS, i.p., 10 mg/kg) til at vise testens følsomhed.

Dosisniveauer

Der anvendes normalt tre forskellige dosisniveauer. Den største dosis bør forårsage tegn på toksisk virkning eller nedsætte de eksponerede dyrs fertilitet. I nogle tilfælde vil et enkelt højt dosisniveau være tilstrækkeligt.

Grænsetest

Når der er tale om ikke-toksiske stoffer, testes en enkeltdosis på 5 g/kg eller gentagen indgift af 1 g/kg/dag.

Fremgangsmåde

Der kan anvendes flere forskellige doseringsskemaer. Normalt gives hele dosis på en gang, men andre skemaer lader sig også anvende.

Hannerne parres efter doseringen individuelt med en eller to ikke-doserede jomfruelige hunner i på hinanden følgende perioder af passende længde. Hunnerne placeres hos hannerne i en periode svarende til mindst en ægcyklus, eller indtil parringen har fundet sted, hvilket konstateres ved tilstedeværelse af sperma i vagina eller en vaginalprop.

Antallet af parringer efter doseringen fastlægges på grundlag af doseringsskemaet, som skal sikre, at alle kønscellestadier er repræsenteret efter doseringen.

Hunner aflives i anden halvdel af drægtighedsperioden, og uterus' indhold undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af levende og døde implantater. Ovarierne undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af corpora lutea.

2. DATA

Data opstilles i tabelform med angivelse af antal hanner samt antal drægtige og ikke drægtige hunner. Resultaterne af hver enkelt parring, herunder identificering af hver enkelt han og hun anføres individuelt. For hver hun anføres parringsuge, hannens dosis og antallet af levende og døde implantater. Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Forholdet mellem døde og levende implantater i forsøgsgruppen sammenlignes med forholdet i kontrolgruppen med henblik på bestemmelse af den letale virkning efter implantation.

Hvis data registreres som tidlige og sene dødsfald, skal dette fremgå af tabellerne. Hvis der foretages vurdering af den letale virkning før implantation, anføres denne. Den letale virkning før implantation kan beregnes som forskellen mellem antallet af corpora lutea og antallet af implantater eller som et lavere gennemsnitligt antal implantationer pr. uterus i forhold til kontrolparringerne.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, de anvendte dyrs alder og vægt, antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne

— teststof, bærestof, de anvendte dosisniveauer og begrundelse for valget af disse, negativ og positiv kontrol, toksicitetsdata

— administrationsmåde og doseringens varighed

— parringsskema

— metode til konstatering af, om parring har fundet sted

— aflivningstidspunkt

— kriterier for registrering af dominante letale gener

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

»B.23. TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 483 »Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test« (1997).

1.1. INDLEDNING

Formålet med in vivo-testen for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr er et påvise, om et stof forårsager strukturelle kromosomafvigelser i spermatogonier fra pattedyr (1) (2) (3) (4) (5). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Den foreliggende metode er ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til det formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker.

Ved denne test måles kromosomhændelser i spermatogonier, og den forventes derfor at kunne forudsige induktion af arvelige mutationer i kimceller.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Ved denne cytogenetiske in vivo-test påvises kromosomaberrationer ved spermatogoniers mitose. Metoden omfatter ikke andre målceller.

For at påvise aberrationer af kromatidtypen i spermatogonier må den første mitotiske celledeling efter behandlingen undersøges, inden eventuelle skader går tabt ved efterfølgende celledelinger. Der kan indhentes yderligere information fra behandlede spermatogonstamceller ved meiotisk kromosomanalyse for aberrationer af kromosomtypen ved diakinese-metafase I, når de behandlede celler bliver til spermatocytter.

Denne in vivo-test er tilrettelagt til at vise, om stoffer, der er mutagene over for somatiske celler, også er aktive i kimceller. Derudover er spermatogontesten relevant for en vurdering af den reelle mutagenicitetsfare, idet der tages hensyn til sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser.

I testiklerne er der flere generationer af spermatogonier til stede, som udviser forskellig følsomhed over for kemisk behandling. På denne måde repræsenterer de påviste aberrationer den samlede reaktion fra behandlede spermatogonpopulationer, hvor resultatet domineres af de mere talrige differentierede spermatogonier. Forskellige generationer af spermatogonier er, alt efter deres placering i testiklerne, i varierende grad i berøring med det almindelige kredsløb på grund af den fysiske og fysiologiske Sertoli-cellebarriere og blod-testikelbarrieren.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Aberration af kromatidtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

Aberration af kromosomtypen: beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

Gap: en kromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

Antalsafvigelse: ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal.

Polyploidi: et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n, osv.).

Strukturel ændring: ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater af kimceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis hanmus og -hamstere, selv om hanner af andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 % af gennemsnitsvægten.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60 %.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne handyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes laboratorieforholdene i mindst fem dage.

1.4.1.4. *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer i spermatogonier in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne.

Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Cyclophosphamid Cyclophosphamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomer acrylamid	79-06-1	201-173-7
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontroldyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med kromosomafvigelser. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. Dyrenes antal

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare handyr.

1.5.2. Behandlingsplan

Teststofferne indgives fortrinsvis ad én eller to gange (dvs. som én behandling eller to behandlinger). De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

I gruppen med højeste dosis udtages der prøver på to tidspunkter efter behandling. Da teststoffet kan indvirke på cellecyklussens kinetik, udtages der er tidlig og en sen prøve, nemlig ca. 24 timer og ca. 48 timer efter behandlingen. For alle andre doser end den højeste dosis udtages en prøve 24 timer eller 1,5 gange cellecyklus efter behandlingen, medmindre et andet prøveudtagningstidspunkt vides at være bedre egnet til påvisning af virkninger (6).

Der kan desuden udtages prøver på andre tidspunkter. For kemikalier, der kan fremkalde kromosom-lagging eller have S-uafhængige virkninger, kan tidligere prøveudtagning være hensigtsmæssigt (1).

Det vurderes i det enkelte tilfælde, om en behandlingsplan med gentagen indgift er velegnet. Ved behandling med gentagen indgift aflives dyrene 24 timer (1,5 cellecykluslængde) efter sidste behandling. Der kan udtages yderligere prøver, hvis det er hensigtsmæssigt.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøver af forsøgsdyr efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. tre-fem timer, for hamster ca. fire-fem timer.

1.5.3. Dosisniveauer

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (7). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død.

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i spermatogonier (f.eks. et lavere forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafaser; faldet må ikke være større end 50 %).

1.5.4. Grænsetest

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg pr. kg legemsvægt indgivet ved én eller i to behandlinger på samme dag, ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. Indgift af doser

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. Præparering af kromosomer

Umiddelbart efter aflivningen udtages der celleopslæmninger fra en eller begge testikler, som udsættes for hyptonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7. Analyse

For hvert dyr bør mindst 100 godt fordelte metafaseceller analyseres (dvs. mindst 500 metafaseceller pr. gruppe). Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet 2n ± 2.

2. DATA

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af celler med strukturelle kromosomaberrationer, og antallet af kromosomaberrationer pr. celle bedømmes. Forskellige typer strukturelle kromosomaberrationer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed.

Hvis der iagttages såvel mitose som meiose, bestemmes forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase som et mål for cytotoksiciteten for alle behandlede dyr og negative kontroldyr i en samlet prøve på 100 celler under deling for hvert dyr. Hvis der kun iagttages mitose, bestemmes mitoseindekset i mindst 1 000 celler for hvert dyr.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (8). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vivo-test for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr viser, at teststoffet fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet, bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr og deres alder

— oprindelse, miljø, føde, mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— begrundelse for indgiftsvej

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for aflivningstidspunkter

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed

— metoder til præparering af objektglas

— kriterier for bedømmelse af aberrationer

— antal analyserede celler pr. dyr

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet

— mitoseindeks

— forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase

— antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr

— samlet antal aberrationer pr. gruppe

— antal celler med aberrationer pr. gruppe

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative kontrolprøver

— data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for sideløbende positive kontrolprøver

— eventuelt iagttagne ploidiændringer

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel. C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss. New York, pp. 477-484.

(2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, *52*, pp. 207-209.

(6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, *312*, pp. 313-318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, *7*, pp. 313-319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B.24 SPOTTEST — MUS

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Spottesten er en in vivo test i mus, hvor musefostre på det embryonale stade eksponeres for kemiske forbindelser. Målcellerne i fostrene er melanoblasterne, og målgenerne er de gener, der bestemmer pelshårenes pigmentering. Fostrene er heterozygote i et antal af disse pelsfarvegener. Ved mutation eller tab af det dominante allel i en melanoblast ved en række genetiske hændelser kommer den recessive fænotype til udtryk i de celler, der dannes fra denne stamcelle, hvilket fører til anderledes farvede pletter i musens pels. Mængden af afkom med sådanne pletter, dvs. mutationer, registreres og sammenlignes med den tilsvarende mængde blandt afkom af hunmus, der kun har været eksponeret for opløsningsmidlet. Ved spottesten i mus konstateres formodede somatiske mutationer i fosterceller.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststoffet opløses eller suspenderes så vidt muligt i isotonisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i passende vehikler. Det anvendte vehikel må ikke indvirke på teststoffet eller forårsage toksiske effekter. Fremstillingen af teststofpræparationen foretages umiddelbart inden anvendelsen.

Forsøgsdyr

Mus af stammen T-stock (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) parres med enten stammen HT-stock (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) eller C57 BL (nonagouti, a/a). Andre egnede krydsninger som NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) og DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) kan anvendes, under forudsætning af, at afkommet er nonagouti.

Antal og køn

Der anvendes et antal drægtige hunner, som er tilstrækkeligt stort til, at der produceres en passende mængde afkom for hver af de anvendte doser. Holdstørrelsen kan anslås på grundlag af antallet af observerede pletter hos de eksponerede mus og kontroldatas størrelsesorden. Et resultat kan først accepteres som negativt, hvis mindst 300 unger af hunner, som har været eksponeret for den største dosis, er undersøgt.

Positive og negative kontroller

Der foretages sideløbende kontrol med mus som kun eksponeres for vehikel (negativ kontrol). Historiske kontroldata fra samme laboratorium kan, under forudsætning af at der er tale om homogene data, indregnes med

henblik på at forøge testens sensitivitet. Der bør foreligge positive kontroldata fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium med en kemisk forbindelse, som vides at være mutagen i denne test, i tilfælde af at der ikke konstateres nogen mutagen virkning af teststoffet.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion i de drægtige hunner. Inhalation og andre administrationsmåder kan anvendes, hvis de er hensigtsmæssige.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst to doseringer, hvoraf den ene skal medføre tegn på toksisk virkning eller reduceret kuldstørrelse. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

Fremgangsmåde

Normalt gives forsøgsdyrene hele dosis på en gang på drægtighedsperiodens dag 8, 9 eller 10, idet dag 1 er den dag, vaginalproppen observeres første gang. Disse dage svarer til 7,25, 8,25 og 9,25 dage efter befrugtningen. Gentagne doseringer kan foretages på disse dage.

Analyse

Afkommet blindkodes og eventuelle pigmenterede pletter registreres mellem tre og fire uger efter fødslen. Der skelnes mellem tre typer pletter:

a) hvide pletter inden for en afstand af 5 mm fra den ventrale midtlinie; disse pletter antages at være et resultat af celledrab (WMVS)

b) gule agouti-agtige pletter på eller omkring pattevorter, kønsåbninger, strube, axiller, lyske og midt i panden; disse pletter antages at være et resultat af fejldifferentiering (MDS)

c) pigmenterede og hvide pletter tilfældigt fordelt i pelsen; disse pletter antages at være et resultat af somatiske mutationer (RS).

Alle tre typer registreres, men kun den sidstnævnte, RS, er genetisk relevant. Hvis der er problemer med at skelne mellem MDS og RS, kan der benyttes fluorescensmikroskopi af hårprøver.

Synlige morfologiske abnormiteter hos afkommet registreres også.

2. DATA

Det samlede antal undersøgte unger og antal unger med en eller flere pletter, som antages at være et resultat af somatisk mutation, anføres. Data fra forsøgsgrupper og negativ kontrolgruppe sammenlignes ved hjælp af egnede statistiske metoder. Data anføres også pr. kuld.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapporten

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte stammer

— antal drægtige hunner i forsøgs- og kontrolgrupperne

— den gennemsnitlige kuldstørrelse i forsøgs- og kontrolgrupperne ved fødslen, og når ungerne er vænnet fra

— dosisniveauer

— opløsningsmiddel

— den dag i drægtighedsperioden, hvor doseringen finder sted

— administreringsform

— det samlede antal undersøgte unger og antal unger med WMVS, MDS og RS i forsøgs- og kontrolgrupperne

— makroskopiske morfologiske abnormiteter

— om muligt dosis-responsforhold for RS

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Evaluering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **REFERENCER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.25 ARVELIG TRANSLOKATION HOS MUS

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Ved test af arvelig translokation hos mus konstateres strukturelle og numeriske kromosomforandringer i pattedyrskønsceller udtrykt i førstegenerations afkom. Kromosomforandringerne, der måles, er reciprokke translokationer, og, når afkommet også omfatter hundyr, tab af et X-kromosom. Bærere af translokationer og XO-hunner har nedsat fertilitet, hvilket udnyttes ved udvælgelsen af F_1-afkom med henblik på cytogenetisk analyse. Visse typer translokationer (X-autosome og c-t-typen) forårsager fuldstændig sterilitet. Translokationer konstateres cytogenetisk i meiosens diakinese-metafase I hos hanner, som enten kan være af F_1-generationen eller sønner af F_1-hunner. XO-hunner identificeres cytogenetisk ved, at kromosomtallet i knoglemarvmitoser kun er 39.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Uopløselige stoffer opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Teststofopløsning anvendes umiddelbart efter fremstillingen. Hvis der anvendes et vehikel med henblik på at lette doseringen, må det ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Andre administrationsmåder kan være hensigtsmæssige.

Forsøgsdyr

Som forsøgsdyr benyttes mus, idet disse giver de letteste betingelser med hensyn til avl og cytologisk verifikation. Der kræves ikke nogen bestemt stamme. Hvis det påregnes at teste fertiliteten, bør den anvendte stammes gennemsnitlige kuldstørrelse være over otte og relativt konstant. Der anvendes sunde kønsmodne dyr.

Antal dyr

Det nødvendige antal dyr afhænger af den spontane translokationsfrekvens og den induktionsfrekvens, som er nødvendig for at opnå et positivt resultat.

Normalt gennemføres testen ved undersøgelse af F_1-hanner. Der undersøges mindst 500 F_1-hanner pr. dosis. Hvis der tillige anvendes F_1-hunner, undersøges 300 af hvert køn.

Negative og positive kontroller

Adækvate kontroldata, stammende fra sideløbende og historiske kontrolforsøg, skal være tilgængelige. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra undersøgelser foretaget for nyligt i det samme laboratorium, kan disse anvendes i stedet for en sideløbende positiv kontrol.

Dosisniveauer

Der testes en dosis, normalt den største dosis med minimal toksisk virkning, men uden indflydelse på reproduktion eller overlevelse. Hvis dosis-responsforholdet skal bestemmes, anvendes yderligere to mindre doser. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

Fremgangsmåde

Eksponering og parring

Der kan anvendes to forskellige eksponeringsskemaer. I det hyppigst anvendte skema gives hele dosis på en gang. Teststoffet kan også gives syv dage om ugen i 35 dage. Antallet af parringer efter eksponeringen afhænger af eksponeringsskemaet og skal være stort nok til at sikre, at alle eksponerede kønscellestadier kan undersøges. Efter parringen placeres hunnerne i hver sit bur. Ved fødslen registreres dato, kuldstørrelse og afkommets køn. Alle hanner blandt afkommet vænnes fra og hunnerne frasorteres, medmindre de medtages i forsøget.

Test af heterozygoti efter translokation

Der anvendes en af to mulige metoder:

— fertilitetsundersøgelse af F_1-generationen med efterfølgende verifikation af mulige translokationsbærere ved hjælp af cytogenetisk analyse

— cytogenetisk analyse af alle F_1-hanner uden forudgående udvælgelse på grundlag af fertilitetsundersøgelser.

a) Fertilitetsundersøgelse

Nedsat fertilitet hos F_1-generationens medlemmer kan konstateres ved observation af kuldstørrelsen og/eller analyse af de parrede hundyrs uterusindhold.

Forinden fastlægges der kriterier for normal og nedsat fertilitet hos den anvendte stamme.

Observation of kuldstørrelse: De F_1-hanner, som skal undersøges, placeres i hver sit bur sammen med hunner fra samme forsøg eller fra bestanden. Fra og med 18 dage efter parringen iagttages burene dagligt. Kuldstørrelse og køn i F_2-generationen registreres ved fødslen, hvorefter kuldene fjernes. Hvis der testes F_1-hunner, bevares de små F_2-kuld med henblik på yderligere undersøgelser. Konstatering af, om hunner er translokationsbærere, forgår ved cytogenetisk analyse af translokation hos en vilkårlig han blandt deres afkom. XO-hunner identificeres gennem ændring af forholdet mellem hanner og hunner i deres afkom fra 1:1 til 1:2. Ved en sekventielt ordnet fremgangsmåde elimineres normale F_1-dyr fra den videre undersøgelse, hvis størrelsen af det første F_2-kuld er lig med eller højere end en på forhånd fastsat normalværdi. I modsat fald observeres det andet eller tredje F_2-kuld. F_1-dyr, der ikke kan klassificeres som normale efter observation af op til tre F_2-kuld underkastes enten yderligere undersøgelse ved analyse af de parrede hunners uterusindhold eller ved direkte cytogenetisk analyse.

Analyse af uterusindholdet: Den nedsatte kuldstørrelse hos translokationsbærere skyldes, at fostrene dør på det embryonale stade, så et stort antal døde implantater tyder på translokation hos forsøgsdyret. De F_1-hanner, som skal undersøges, parres hver især med to til tre hunner. Ved daglig undersøgelse mellem kl. 10 og 12 om formiddagen af forekomsten af vaginalprop, konstateres det, om befrugtning har fundet sted. Hunnerne aflives 14 til 16 dage senere, og antallet af levende og døde implantater i uteri registreres.

b) Cytogenetisk analyse

Der fremstilles testikelpræparater ved lufttørringsteknik. Translokationsbærere identificeres på grundlag af multivalente konfigurationer i primære spermatocytters diakinese-metafase I. Hvis der observeres mindst to celler med multivalente konfigurationer betragtes det som bevist, at forsøgsdyret er translokationsbærer.

Når der ikke gennemføres udvælgelse på basis af fertilitetsundersøgelser, undersøges alle F_1-hanner cytogenetisk. Der foretages mikroskopisk undersøgelse af mindst 25 diakinesemetafaser I pr. han. F_1-hanner med små testikler og defekt meiose, som standser før diakinesen, samt F_1-hunner, som formodes at være XO-bærere, underkastes undersøgelse af mitotiske metafaser i spermatogonier eller knoglemarv. Hvis der observeres usædvanlig lange og/eller korte kromosomer i ti celler, betragtes det som påvist, at der er tale om en translokation, som gør hanner sterile (c-t-typen). Visse X-autosome translokationer, som gør hanner sterile, kan kun identificeres ved båndanalyse af mitosekromosomer. Hvis der observeres 39 kromosomer i ti mitoser, betragtes det som påvist, at der er tale om en XO-hun.

2. DATA

Data opstilles i tabelform.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse og kønsfordeling i forældregenerationens afkom ved fødslen og ved afvænningen angives for hver parringsperiode.

Med henblik på vurdering af F_1-dyrenes fertilitet anføres den gennemsnitlige kuldstørrelse efter de normale parringer og hver enkelt kuldstørrelse efter parring af F_1-translokationsbærere. Efter analyse af uterusindhold anføres det gennemsnitlige antal levende og døde implantater efter normale parringer og antallet af levende og døde implantater efter hver enkelt parring af F_1-translokationsbærere.

Efter cytogenetisk analyse af diakinese-metafaser I anføres antallet af multivalente konfigurationer og det totale antal undersøgte celler for hver enkelt translokationsbærer.

Det samlede antal parringer og parringsperiodernes længde anføres for sterile F_1-dyr. Der gives detaljerede oplysninger om testikelvægt og cytogenetisk analyse.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse, F_2-afkommets kønsfordeling og resultaterne af den cytogenetiske analyse anføres for XO-hunner. Hvis mulige F_1-translokationsbærere udvælges ved fertilitetsundersøgelser, skal tabellerne indeholde oplysninger om, hvor mange af de udvalgte dyr der senere viste sig at være heterozygote efter translokation.

Data fra negative og positive kontrolforsøg rapporteres på lignende måde.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- stamme, dyrenes alder, de doserede dyrs vægt, antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne i forældregenerationen
- antal af forældredyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupper
- forsøgsbetingelser, detaljeret beskrivelse af dyrenes behandling, dosisniveau, opløsningsmidler, parringsskema
- afkommets antal og køn for hver enkelt hun, antal og køn af afkom, som opdrættes med henblik på translokationsanalyse
- translokationsanalytiske kriterier og analysetidspunkt
- antal translokationsbærere samt detaljeret beskrivelse af disse, herunder avlingsdata og oplysninger om uterusindhold, hvis sådanne foreligger
- cytogenetisk fremgangsmåde og detaljerede oplysninger om den mikroskopiske analyse, helst vedlagt billeder
- statistisk evaluering
- diskussion af resultaterne
- fortolkning af resultaterne.

3.2. Evaluering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. REFERENCER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.26. SUBKRONISK ORAL TOKSICITETS-TEST

ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ GNAVERE

1. METODE

Denne metode til udførelse af en subkronisk oral toksicitets-test svarer til OECD TG 408 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Efter at en akut eller gentagen 28-dages toksicitets-test er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en subkronisk oral toksicitets-test, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Undersøgelsen på 90 dage skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen belastning i en længere periode, som dækker afvænning, modning og den første del af voksenlivet. Undersøgelsen skaffer viden om større toksiske virkninger, peger på, hvilke organer der rammes og muligheden for akkumulation; den kan give et overslag over det belastningsniveau, der kan være skadeligt, uden at det bemærkes, som igen kan anvendes til valg af dosis til undersøgelser af kronisk effekt og til fastlæggelse af sikkerhedskriterier for, hvad mennesker kan tåle.

Metoden lægger yderligere vægt på virkninger på neurologiske områder og peger på virkninger på det immunologiske og reproduktive system. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget. Undersøgelsen skulle muliggøre identifikation af kemikalier med neurotoksiske virkninger og virkninger på det immunologiske og reproduktive system, som kan føre til yderligere dybdegående undersøgelser.

Se også Generel Introduktion, del B.

1.2. DEFINITIONER

Dosis: Mængden af indgivet test-kemikalium. Dosis angives som vægt (g, mg) eller som vægt af test-kemikalium i forhold til dyrets vægt (fx mg/kg) eller en konstant del af føden (ppm).

Dosering: Er et generelt udtryk for dosis, hyppighed af indgift og varigheden af indgiften.

NOAEL: Er en forkortelse for det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning, og er det højeste dosis-niveau, hvor ingen negative virkninger, der kan tilskrives behandlingen, er fundet.

1.3. TEST-METODENS PRINCIP

Test-kemikaliet administreres peroralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 90 dage. I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på forgiftning. Dyr, der dør eller aflives, mens testen står på, bliver obduceret, og ved undersøgelsens afslutning bliver resten af dyrene aflivet og obduceret.

1.4. BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.4.1. Forberedelse af dyrene

Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene i mindst fem dage, og som ikke før har været anvendt til eksperimenter. Dyrene beskrives hvad angår art, stamme, hvorfra de kommer («kilde»), køn, vægt og/eller alder. Dyrenes randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Bure skal anbringes, så deres placering får mindst mulig betydning. Hvert dyr tildeles et eget, særligt identifikationsnummer.

1.4.2. Fremstilling af doser

Stoffet, der skal undersøges, indgives gennem sonde eller i føden eller drikkevandet. Måden at indgive på afhænger af undersøgelsens formål og test-materialets fysisk-kemiske egenskaber.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes stoffet i et passende medie. Hvor mulig anbefales det først at forsøge at anvende vandige opløsninger eller opslæmninger; dernæst overvejes opløsninger eller opslæmninger i olie (fx majsolie) og først derefter andre opløsnings-/opslæmningsmidler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Test-kemikaliets stabilitet i forbindelse med indgiften bør fastslås.

1.4.3. Test-omstændighederne

1.4.3.1. *Forsøgsdyrene*

Den foretrukne art er rotten, men andre gnaverarter, fx mus, kan anvendes. Almindeligt anvendte laboratoriestammer af unge, sunde, voksne dyr bør anvendes. Hundyrene skal ikke have haft unger og ikke være gravide. Indgiften bør begynde snarest efter fravænning, og i hvert fald før dyrene er ni uger gamle. Ved forsøgets begyndelse bør den indbyrdes vægtforskel være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnittet for hvert køn. Når forsøget foretages som forløber for en længerevarende toksicitetsstudie, bør man i begge forsøg anvende samme stamme og fra samme kilde.

1.4.3.2. *Antal og køn*

Mindst 20 dyr (ti af hvert køn) bør anvendes for hvert dosisniveau. Hvis man planlægger at aflive nogle dyr undervejs i forsøget, skal antallet af dyr, der påbegynder forsøget, forøges tilsvarende. Ud fra tidligere opnået viden om kemikaliet eller nære analoge stoffer bør man overveje en yderligere »satellit«-gruppe på ti dyr (fem af hvert køn) i kontrollen og i gruppen med den højeste dosis, således at man efter forsøgsperioden kan observere evt. reversibilitet eller vedvarende følger af behandlingen. Varigheden af denne observationsperiode afhænger af, hvilke virkninger man vil følge.

1.4.3.3. *Dosisstørrelse*

Mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se 1.4.3.4). Dosisstørrelsen kan afhænge af tidligere tilsvarende forsøg eller forsøg med henblik på opsøgning af dosisgrænser og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og tokso-kinetiske data for test-kemikaliet eller tilsvarende stoffer. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske natur eller biologiske effekt sætter grænser, bør den højeste dosisstørrelse vælges med henblik på toksisk virkning, men ikke på død eller alvorlig lidelse. Faldende dosisstørrelse bør vælges med henblik på at påvise en eventuel dosisrelateret virkning og det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL). To til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde test-gruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (fx mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne.

Kontrolgruppen skal være en ubehandlet gruppe eller en gruppe, der får det eventuelle medie, i hvilket de behandlede dyr får kemikaliet. Bortset fra behandlingen skal dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i test-gruppen. Hvis kemikaliet indgives i et medie, skal kontrolgruppen have mediet i den største anvendte mængde. Hvis test-kemikaliet indgives via foderet, og hvis dette medfører reduceret fødeindtagelse, kan det være nyttigt med en gruppe, der parallel-fodres mængdemæssigt, således at et eventuelt vægttab kan tilskrives, at foderet har en dårlig smag, respektive virker toksisk.

Man bør overveje mediets eller eventuelle additivers egenskaber med hensyn til absorption, distribution, stofskifte eller retention af test-kemikalium; virkningen på test-kemikaliets kemiske egenskaber, som igen kan have indflydelse på dets toksiske egenskaber; og indflydelsen på føde- eller vandindtag eller dyrenes ernæringsmæssige tilstand.

1.4.3.4. *Grænse-test*

Et total-forsøg med tre dosisstørrelser behøves næppe udført, hvis man ikke forventer nogen toksisk effekt ud fra kendskab til strukturelt beslægtede stoffer, og hvis der ikke ses nogen skadelig virkning ved forsøg som beskrevet ovenfor med enkelt dosis svarende til mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. Grænse-test er konklusive, undtagen hvis belastning af mennesker indikerer nødvendigheden af anvendelse af en større dosis.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dosisadministration**

Dyrene får test-kemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 90 dage. Ethvert andet regime, fx fem gange ugentlig, skal begrundes. Hvis test-kemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, der kan tilføres ad gangen, afhænger af dyrets størrelse. Volumen bør ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt, undtaget vandige opløsninger, hvor man kan indgive 2 ml/100 g kropsvægt. Undtaget irritative og ætsende stoffer, som normalt vil have øget generende effekt ved større koncentrationer, bør variationen i test-volumen begrænses ved justering af koncentrationen af test-kemikaliet for at sikre et konstant volumen ved alle dosisstørrelser.

Det er vigtigt at sikre, at de kvantiteter af kemikalier, som indtages via føden eller drikkevandet, ikke får indflydelse på den normale ernæring eller vandbalancen. Når test-kemikaliet tilføres med føden, kan man tilføre det enten som en konstant del af føden (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets vægt; det, man vælger, skal specificeres. Tilføres kemikaliet via sonde, bør det gøres på samme tidspunkt hver dag, og dosisstørrelse skal rettes til, så den udgør en konstant størrelse i forhold til dyrets vægt. Hvis et 90-dages forsøg foretages som forløber for et langtids kronisk-toksicitetsforsøg, skal der i begge forsøg gives samme fødesammensætning.

1.5.2. **Observationer**

Observationsperioden skal mindst vare 90 dage. Dyrene i »satellit«-gruppen, hvor man vil foretage »follow-up«-observationer, skal beholdes i en passende periode uden behandling, med henblik på konstatering af fortsat eller ophør af toksisk virkning.

Almindelig klinisk observation bør foretages mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter indgift. Dyrenes kliniske tilstand bør noteres. Mindst to gange daglig, sædvanligvis morgen og aften, undersøges alle dyrene for tegn på morbiditet eller mortalitet.

I hvert fald før første belastning (for at tage højde for individuelle forskelle) og en gang ugentlig derefter bør detaljerede kliniske undersøgelse foretages af alle dyrene. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scorings-system, eksplicit defineret af undersøgelseslaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i observationsbetingelserne er mindst mulige. Blandt de fund, der skal noteres, (men ikke som de eneste) er ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskreter og autonom aktivitet (fx tåreflåd, hår-rejsning, pupilstørrelse, usædvanlig respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (fx overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (fx selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (1).

Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet, passende udstyr bør udføres før første gang, test-kemikaliet tilføres, og ved afslutning af forsøget, fortrinsvis på alle dyrene, men i hvert fald på dem, der fik højeste dosis og på kontrollerne. Hvis der opdages øjenforandringer, skal alle dyrene undersøges.

Hen imod slutningen af belastningsperioden og i hvert fald ikke tidligere end uge 11 foretages undersøgelser af reaktion på sensoriske stimuli af forskellig slags (1) (fx auditoriske, visuelle og proprioceptive stimuli) (2), (3), (4), vurdering af gribe-styrke (5) og af motorisk aktivitet (6). Nærmere detaljer af de procedurer, der kan foretages, findes i de respektive referencer. Andre, alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

Funktionsundersøgelser kan udelades nær forsøgets afslutning, hvis tilsvarende data kan findes i andre tilsvarende forsøg og de daglige kliniske undersøgelser ikke påviste funktionelle mangler.

Undtagelsesvis kan funktionsundersøgelser udelades på grupper, der på anden vis viser tegn på forgiftning i en grad, der vil have afgørende indflydelse på funktionsundersøgelserne.

1.5.2.1. *Kropsvægt og føde/vand-indtagelse*

Alle dyr skal vejes mindst en gang ugentlig. Mængden af fødeindtagelse skal beregnes mindst en gang ugentlig. Hvis test-kemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst en gang ugentlig. Vandforbruget bør også tages i betragtning, når belastningen foretages via føden eller via sonde, da drikke-aktiviteten kan ændres herved.

1.5.2.2. *Hæmatologi og klinisk biokemi*

Stedet, hvor blodprøver tages, bør angives, og de bør gemmes på passende vis. Ved forsøgets afslutning tages der prøver lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene.

Følgende hæmatologiske undersøgelser bør foretages ved forsøgets afslutning, og når blodprøver bliver indsamlet undervejs: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentrationen, erytrocyttal, leukocyttal og differentialtælling, trombocyttal og koagulationstid/koagulationsevnen.

Klinisk biokemiske analyser, som kan vise toksisk virkning på væv, specielt på lever og nyrer, skal udføres på blodprøver taget fra alle dyrene lige før eller i forbindelse med aflivningen (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget). På samme måde, som gælder for hæmatologiske prøver, undersøges også blodprøver taget undervejs. Det anbefales at tage fastende blodprøver ([1]). Analyser på serum og plasma bør inkludere: natrium, kalium, glukose, total kolesterol, carbamid, BUN, kreatinin, total protein og albumin, og mere end to enzymer, der belyser den hepatocellulære effekt (fx alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk fosfatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Derudover kan inkluderes måling af andre enzymer (fra lever eller andetsteds), galdesure salte, som kan give nyttig information i visse tilfælde.

I den sidste uge af forsøget kan eventuelt følgende urinanalyser udføres, idet timediuresen måles: udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, protein, glukose og blod eller blodceller.

Yderligere bør man overveje at måle serummarkører for generel vævsskade. Andre analyser, som bør udføres, hvis test-kemikaliets egenskaber vides eller formodes at afficere beslægtede metaboliske markører, inkluderer calcium, fosfor, fastende triglycerider, specielle hormoner, methæmoglobin og kolinesterase. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

Almindeligvis må man have en fleksibel indstilling ud fra dyrearten og de observerede og/eller forventede virkninger af et givet kemikalium.

Hvis der ikke er tilstrækkeligt kendskab til de biokemiske eller hæmatologiske udgangsværdier, bør man overveje om disse analyser skal foretages, før belastningen begynder, men det anbefales almindeligvis ikke (7).

1.5.2.3. *Makroskopisk obduktion*

Alle dyrene, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, uterus, ovarier, thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor fødeindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med test-kemikaliet. Hvis blodprøver tages fastende, skal de tages efter udførelsen af de funktionelle observationer.

Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fiksationsmedie både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse: alle større læsioner, hjernen (repræsentative regioner, inklusive cerebrum, cerebellum og medulla/pons), rygmarven (fra tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal), hypofyse, tyreoidea og paratyreoidea, tymus, øsofagus, spytkirtlerne, mavesækken, tynd- og tyktarm, (inklusive de Peyerske plaques) lever, pankreas, nyrer, binyrer, milt, hjerte, luftrør og lunger (bevaret ved indblæsning med fiksativ og påfølgende neddypning), aorta, gonader, uterus, sekundære kønsorganer, brystkirtlerne fra hundyrene, prostata, urinblære, galdeblære (mus), lymfeknuder (helst en lymfeknude, som dækker belastningsvejen, og en anden langt derfra for at dække den systemiske virkning), perifer nerve (ischiadicus eller tibialis) helst nær ved musklen, en sektion af knoglemarven (og/eller frisk knoglemarvsaspirat), hud og øjne (hvis oftalmologisk undersøgelse viste ændringer). Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for test-kemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

1.5.2.4. *Histopatologi*

En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelserne skal omfatte alle dyrene i de andre grupper, også hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

Alle større læsioner skal undersøges.

Hvis der anvendes en »satellit«-gruppe, skal der på dem udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i den belastede gruppe.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. DATA

Alle data skal anføres. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver test-gruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på forgiftning, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og forgiftningsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget.

2.2. TEST-RAPPORT

Test-rapporten skal inkludere følgende informationer:

2.2.1. **Test-kemikalium:**

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— indgivelsesmåde, som begrundes, hvis der ikke er tale om drikkevand.

2.2.2. **Dyreart:**

— anvendte art og stamme

— antal dyr, deres alder og køn

— kilde, opbevaringsforhold, føde etc.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

2.2.3. **Forsøgsbetingelser:**

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende test-kemikaliets form/opblanding i føden, resulterende koncentration, stabilitet og homogenitet

— detaljer vedrørende indgift af test-kemikaliet

— sande dosis (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra test-kemikaliets koncentration i føde/vand (ppm) til sand dosis, hvis muligt

— detaljer vedrørende kvalitet af vand og føde.

2.2.4. **Resultater:**

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— fødeindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende forgiftning sat over for køn og dosis, inklusive forgiftningstegnene

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— resultater af oftalmologisk undersøgelse

— vurdering, hvis muligt, af sanse-aktiviteter, gribe-styrke og motorisk aktivitet

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— slutvægt, organernes vægt og organ/kropsvægt-forholdene

— sektionsfund

— en detaljeret beskrivelse af de histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— statistisk behandling af resultaterne, hvor rimeligt.

Diskussion af resultater.

Konklusioner.

3. **REFERENCER**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser, V. C., Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C., Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C., Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). 'Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies', Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198-201.

B.27. SUBKRONISK ORAL TOKSICITETS-TEST

ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ IKKE-GNAVERE

1. METODE

Denne metode til udførelse af en subkronisk oral toksictets-test svarer til OECD TG 409 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Efter at en akut eller gentagen 28-dages toksicitets-test er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en subkronisk oral toksicitets-test, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Undersøgelsen på 90 dage skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen belastning i en periode med hurtig vækst, modning og den første del af voksenlivet. Undersøgelsen skaffer viden om større toksiske virkninger, peger på, hvilke organer der rammes og muligheden for akkumulation; den kan give et overslag over det belastningsniveau, der kan være skadeligt, uden at det bemærkes, som igen kan anvendes til valg af dosis til undersøgelser af kronisk effekt og til fastlæggelse af sikkerhedskriterier for, hvad mennesker kan tåle.

Undersøgelsesmetoder muliggør, at man på dyrearter, der ikke er gnavere, finder frem til negative virkninger ved belastning med kemikalier, og den bør kun bruges:

— hvor virkninger i andre undersøgelser peger på nødvendigheden af afklaring/karakterisering i en anden dyreart end gnavere, eller

— hvor toksiko-kinetiske undersøgelser peger på, at anvendelse af en speciel dyreart, der ikke er gnaver, er det mest relevante valg blandt laboratoriedyr, eller

— hvor andre specielle grunde retfærdiggør anvendelsen af dyrearter, der ikke er gnavere.

Se ligeledes Generel Introduktion, del B.

1.2. DEFINITIONER

Dosis: Mængden af indgivet test-kemikalium. Dosis angives som vægt (g, mg) eller som vægt af test-kemikalium i forhold til dyrets vægt (fx mg/kg) eller en konstant del af føden (ppm).

Dosering: Er et generelt udtryk for dosis, hyppighed af indgift og varigheden af indgiften.

NOAEL: Er en forkortelse for det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning, og er det højeste dosis-niveau, hvor ingen negative virkninger, der kan tilskrives behandlingen, er fundet.

1.3. TEST-METODENS PRINCIP

Test-kemikaliet administreres peroralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 90 dage. I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på forgiftning. Dyr, der dør eller aflives, mens testen står på, bliver obduceret og ved undersøgelsens afslutning bliver resten af dyrene aflivet og obduceret.

1.4. BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.4.1. Valg af dyreart

Den hyppigst anvendte ikke-gnaverdyreart er hunden, som bør være af en veldefineret race; beagle-hunde er ofte anvendt. Af andre arter bruges fx også grise og minigrise. Primater anbefales ikke, og brug af dem skal forsvares. Der skal anvendes unge, sunde dyr, og for hunde bør belastningen begynde fortrinsvis ved 4 til 6-månedsalderen og ikke senere end ved 9-månedsalderen. Når der er tale om et primærforsøg efterfulgt af

et langtidsforsøg med kronisk toksicitet, bør man anvende samme dyreart i begge forsøg.

1.4.2. Forberedelse af dyrene

Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene og som ikke før har været anvendt til eksperimenter. Varigheden af tilvænning afhænger af den valgte dyreart og kilden. Mindst fem dage for hunde og grise, der er opdrættet til formålet og hører til i en stedlig koloni, men mindst to uger for disse dyr, hvis de kommer udefra. Dyrene beskrives hvad angår art, stamme, hvorfra de kommer (»kilde«), køn, vægt og/eller alder. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Bure skal anbringes, så deres placering får mindst mulig betydning. Hvert dyr tildeles et eget, særligt identifikationsnummer.

1.4.3. Fremstilling af doser

Stoffet, der skal undersøges, kan indgives via føden eller drikkevandet, ved hjælp af sonde eller i kapsler. Måden at indgive på gennem munden afhænger af undersøgelsens formål og test-materialets fysisk-kemiske egenskaber.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes stoffet i et passende medie. Hvor muligt anbefales det først at forsøge at anvende vandige opløsninger eller opslæmninger; dernæst overvejes opløsninger eller opslæmninger i olie (fx majsolie) og først derefter andre opløsnings-/opslæmningsmidler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Test-kemikaliets stabilitet i forbindelse med indgiften bør fastslås.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. Antal dyr og deres køn

Mindst otte dyr (fire af hvert køn) bør anvendes for hvert dosisniveau. Hvis man planlægger at aflive nogle dyr undervejs i forsøget, skal antallet af dyr, der påbegynder forsøget, forøges tilsvarende. Antallet af dyr ved forsøgets afslutning må være tilstrækkelig stort, så evalueringen af den toksiske virkning er mulig. Ud fra tidligere opnået viden om kemikaliet eller nære analoge stoffer bør man overveje en yderligere »satellit«-gruppe på otte dyr (fire af hvert køn) i kontrollen og i gruppen med den højeste dosis, således at man efter forsøgsperioden kan observere evt. reversibilitet eller vedvarende følger af behandlingen. Varigheden af denne observationsperiode afhænger af, hvilke virkninger man vil følge.

1.5.2. Dosisstørrelse

Mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se 1.5.3). Dosisstørrelsen kan afhænge af tidligere tilsvarende forsøg eller forsøg med henblik på opsøgning af dosisgrænser og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og tokso-kinetiske data for test-kemikaliet eller tilsvarende stoffer. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske natur eller biologiske effekt sætter grænser, bør den højeste dosisstørrelse vælges med henblik på toksisk virkning, men ikke på død eller alvorlig lidelse. Faldende dosisstørrelse bør vælges med henblik på at påvise en eventuel dosisrelateret virkning og det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL). To til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde test-gruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (fx mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne.

Kontrolgruppen skal være en ubehandlet gruppe eller en gruppe, der får det eventuelle medie, i hvilket de behandlede dyr får kemikaliet. Bortset fra behandlingen skal dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i test-gruppen. Hvis kemikaliet indgives i et medie, skal kontrolgruppen have mediet i den størst anvendte mængde. Hvis test-kemikaliet indgives via foderet, og hvis dette medfører reduceret fødeindtagelse, kan det være nyttigt med en gruppe, der parallel-fodres mængdemæssigt, således at et eventuelt vægttab kan tilskrives, at foderet har en dårlig smag, respektive virker toksisk.

Man bør overveje mediets eller eventuelle additivers egenskaber med hensyn til absorption, distribution, stofskifte eller retention af test-kemikalium; virkningen på test-kemikaliets kemiske egenskaber, som igen kan have indflydelse på dets toksiske egenskaber; og indflydelsen på føde- eller vandindtag eller dyrenes ernæringsmæssige tilstand.

1.5.3. Grænse-test

Et total-forsøg med tre dosisstørrelser behøves næppe udført, hvis man ikke forventer nogen toksisk effekt ud fra kendskab til strukturelt beslægtede stoffer, og hvis der ikke ses nogen skadelig virkning ved forsøg som beskrevet ovenfor med enkelt dosis svarende til mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. Grænse-test er konklusive, undtagen hvis belastning af mennesker indikerer nødvendigheden af anvendelse af en større dosis.

1.5.4. Dosisadministration

Dyrene får test-kemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 90 dage. Ethvert andet regime, fx fem gange ugentlig, skal begrundes. Hvis test-kemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, der kan tilføres ad gangen, afhænger af dyrets størrelse. Normalt bør volumen holdes så lavt som muligt. Undtaget irritative og ætsende stoffer, som normalt vil have øget generende effekt ved større koncentrationer, bør variationen i test-volumen begrænses ved justering af koncentrationen af test-kemikaliet for at sikre et konstant volumen ved alle dosisstørrelser.

Det er vigtigt at sikre, at de kvantiteter af kemikalier, som indtages via føden eller drikkevandet, ikke får indflydelse på den normale ernæring eller vandbalancen. Når test-kemikaliet tilføres med føden, kan man tilføre det enten som en konstant del af føden (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets vægt; det, man vælger, skal specificeres. Tilføres kemikaliet via sonde eller kapsel, bør det gøres på samme tidspunkt hver dag, og dosisstørrelse skal rettes til, så den udgør en konstant størrelse i forhold til dyrets vægt. Hvis et 90-dages forsøg foretages som forløber for et langtids kronisk-toksicitetsforsøg, skal der i begge forsøg gives samme fødesammensætning.

1.5.5. Observationer

Observationsperioden skal mindst vare 90 dage. Dyrene i »satellit«-gruppen, hvor man vil foretage »follow-up«-observationer, skal beholdes i en passende periode uden behandling, med henblik på konstatering af fortsat eller ophør af toksisk virkning.

Almindelig klinisk observation bør foretages mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter indgift. Dyrenes kliniske tilstand bør noteres. Mindst to gange daglig, sædvanligvis morgen og aften, undersøges alle dyrene for tegn på morbiditet eller mortalitet.

I hvert fald før første belastning (for at tage højde for individuelle forskelle) og en gang ugentlig derefter bør detaljerede kliniske undersøgelse foretages af alle dyrene. Disse undersøgelser skal foretages, hvor det er praktisk muligt, uden for burene, på et standardareal og fortrinsvis på samme tid i hvert tilfælde. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i observationsbetingelserne er mindst mulige. Blandt de fund, der skal noteres (men ikke som de eneste), er ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskreter og autonom aktivitet (fx tåreflåd, hår-rejsning, pupilstørrelse, usædvanlig respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (fx overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel skal også noteres.

Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet, passende udstyr bør udføres før test-kemikaliet tilføres første gang og ved afslutning af forsøget, fortrinsvis på alle dyrene, men i hvert fald på dem, der fik højeste dosis og på kontrollerne. Hvis der opdages øjenforandringer, der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges.

1.5.5.1. *Kropsvægt og føde/vand-indtagelse*

Alle dyr skal vejes mindst en gang ugentlig. Mængden af fødeindtagelse skal beregnes mindst en gang ugentlig. Hvis test-kemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst en gang ugentlig. Vandforbruget bør også tages i betragtning, når belastningen foretages via føden eller via sonde, da drikke-aktiviteten kan ændres herved.

1.5.5.2. *Hæmatologi og klinisk biokemi*

Stedet, hvor blodprøver tages, bør angives, og de bør gemmes på passende vis. Ved forsøgets afslutning tages der prøver lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene.

Hæmatologi, inkluderende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, tælling af røde og hvide blodlegemer, differentialtælling, trombocyttælling og et mål for koagulationsevnen, som fx koagulationstid, protrombintid eller tromboplastintid, bør måles før forsøget påbegyndes, siden hver måned eller midtvejs i forsøget og endelig ved forsøgets afslutning.

Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra alle dyrene ved forsøgets begyndelse, siden enten hver måned eller midtvejs i forsøget og til sidst ved forsøgets afslutning. Man bør måle elektrolytbalancen, kulhydratstofskiftet og lever- og nyrefunktionen. Valg af særlige målinger vil afhænge af test-kemikaliets virkningsmåde. Dyrene bør faste, afhængig af dyrearten, før blodprøvetagningen. Det foreslås, at man måler calcium, fosfor, klorid, kalium, natrium, fastende glukose, alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, ornitin decarboksylase, gammaglutamyl transpeptidase, carbamid, albumin, serumkreatinin, total bilirubin og total serumprotein.

Urinanalyser bør udføres i hvert fald ved begyndelsen, midtvejs og ved afslutningen af forsøget, med opsamling af timediuresen. Analyserne inkluderer udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller. Andre parametre kan inkluderes, hvor man finder det nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.

Herudover bør man overveje måling af markører for generel vævsskade. Andre målinger, som kan være nødvendige for en tilstrækkelig toksikologisk vurdering, inkluderer analyser af lipider, hormoner, syre/base-balancen, methæmoglobin, og hæmning af kolinesterasen. Hvor det skønnes nødvendigt, kan andre biokemiske målinger inddrages for at udvide undersøgelsen af observerede virkninger. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

Almindeligvis må man have en fleksibel indstilling ud fra dyrearten og de observerede og/eller forventede virkninger af et givet kemikalium.

1.5.5.3. *Makroskopisk obduktion*

Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever med galdeblære, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, ovarier, uterus, tyreoidea med paratyreoideae, thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fiksationsmedie både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse: alle større læsioner, hjernen (repræsentative regioner, inklusive cerebrum, cerebellum og medulla/pons), rygmarven (fra tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal), hypofyse, øjne, tyreoidea, paratyreoideae, tymus, øsofagus, spytkirtlerne, mavesækken, tynd- og tyktarm, (inklusive de Peyerske plaques) lever, galdeblære, pankreas, nyrer, binyrer, milt, hjerte, luftrør og lunger, aorta, gonader, uterus, sekundære kønsorganer, brystkirtlerne fra hundyrene, prostata, urinblære, lymfeknuder (helst en lymfeknude, som dækker belastningsvejen, og en anden langt derfra for at dække den

systemiske virkning), perifer nerve (ischiadicus eller tibialis) helst nær ved musklen, en sektion af knoglemarven (og/eller frisk knoglemarvsaspirat), hud. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for test-kemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

1.5.5.4. *Histopatologi*

En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på i hvert fald alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelsen skal omfatte alle dyrene i de andre gruppe også, hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

Alle større læsioner skal undersøges.

Hvis der anvendes en »satellit«-gruppe, skal der på dem udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i den belastede gruppe.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. DATA

Alle data skal anføres. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver test-gruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på forgiftning, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og forgiftningsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget.

2.2. TEST-RAPPORT

Test-rapporten skal inkludere følgende informationer:

2.2.1. **Test-kemikalium:**

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— indgivelsesmåde, som begrundes, hvis der ikke er tale om drikkevand.

2.2.2. **Dyreart:**

— anvendte art og stamme

— antal dyr, deres alder og køn

— kilde, opbevaringsforhold, føde etc.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

2.2.3. **Forsøgsbetingelser:**

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende test-kemikaliets form/opblanding i føden, resulterende koncentration, stabilitet og homogenitet

— detaljer vedrørende indgift af test-kemikaliet

— sande dosis (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra test-kemikaliets koncentration i føde/vand (ppm) til sand dosis, hvis muligt

— detaljer vedrørende kvalitet af vand og føde.

2.2.4. **Resultater:**

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— fødeindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende forgiftning sat over for køn og dosis, inklusive forgiftningstegnene

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— oftalmologisk undersøgelse

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— slutvægt, organernes vægt og organ/kropsvægt-forholdene

— sektionsfund

— en detaljeret beskrivelse af de histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— statistisk behandling af resultaterne, hvor rimeligt.

Diskussion af resultater.

Konklusioner.

B.28 SUBKRONISK TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN

90 DAGES GENTAGEN DOSERING PÅ HUD UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet påføres dagligt huden på grupper af forsøgsdyr, idet der gives en bestem gradueret dosis til hver gruppe gennem en periode på 90 dage. Dyrene observeres dagligt i forsøgsperioden. Eventuelle tegn på toksicitet registreres. De dyr, der dør under forsøget eller aflives ved afslutningen af forsøget, obduceres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Dyrene holdes under forsøgsbetingelserne med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i grupper. Kort før forsøget indledes, klippes pelsen på ryggen på forsøgsdyrene. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Klipningen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipning eller barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af dyrets overflade skal kunne anvendes til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område, der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel for at sikre god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet. Der skal anvendes daglig applikation fem til syv dage ugentligt.

Forsøgsbetingelser

Forsøgsdyr

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer. For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at variationen i deres vægt ikke må overskride ± 20 % af en rimelig gennemsnitsvægt. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Der anvendes mindst 20 dyr (ti hunner og ti hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Det kan i nogle tilfælde begrundes at vælge et mindre antal forsøgsdyr, navnlig når der er tale om kaniner.

Dosisniveauer

Til forsøget anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre. Hvis et vehikel anvendes, anvendes ud over en kontrolgruppe en vehikelkontrolgruppe.

Applikationsperioden skal være mindst seks timer dagligt, samme periode hver dag.

Vehikelkontrolgruppen doseres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk effekt men ikke forårsage dødsfald eller kun meget begrænset dødelighed. Den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør den laveste dosis ikke overskride denne eksponering.

Ideelt set bør middeldosis frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end en middeldosis, bør de gradueres med henblik på at opnå en graduering af den toksiske virkning. I den lavt doserede og middeldoserede gruppe og i kontrolgrupperne bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, bør koncentrationen sænkes, og der kan derved ske en reduktion eller et fuldstændigt bortfald af de øvrige toksiske effekter på den højeste dosis. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at afbryde forsøget og foretage et nyt forsøg med en lavere koncentration.

Grænsetest

Hvis et dosisniveau på 1 000 mg/kg legemsvægt eller et højere dosisniveau fastsat ud fra kendskabet til den eventuelle eksponering, mennesker udsættes for, ikke giver nogen toksisk virkning, kan yderligere forsøg betragtes som unødvendige.

Observationsperiode

Dyrene observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkt for toksicitetstegns optræden og forsvinden skal registreres.

Fremgangsmåde

Dyrene skal holdes i hvert sit bur. Den ideelle dosering er påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 90 dage.

Eventuelle satellitgrupper beregnet til efterfølgende observationer bør holdes under observation i yderligere 28 dage, efter at påføringen af teststoffet er afsluttet, således at man har mulighed for at registrere, om toksiske virkninger er reversible eller om de persisterer. Ekspositionsperioden skal være seks timer dagligt.

Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede kropsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden dækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, så det sikres, at dyrene ikke indtager teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet, men man bør ikke immobilisere dem fuldstændigt.

Ved eksponeringsperiodens slutning fjernes eventuelt tilbagesiddende teststof, idet der anvendes vand eller en anden egnet metode til at rense huden.

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen, og dyrene vejes en gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets afslutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgrupperne. Døende dyr skal fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes normalt følgende undersøgelser:

a) Oftalmologisk undersøgelse med anvendelse af et oftalmoskop eller lignende passende udstyr skal foretages inden påføring af teststoffet og ved undersøgelsens afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men sker dette ikke, undersøges mindst den gruppe, der påføres den højeste dosis og kontrolgruppen. Hvis der observeres forandringer i øjnene, skal alle dyrene undersøges.

b) Hæmatologiske undersøgelser omfattende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocyttælling, måling af koaguleringsevne f.eks. koagulationstid, protrombintid, tromboplastintid eller blodpladetælling skal foretages ved forsøgets afslutning.

c) Klinisk biokemisk analyse af blod skal foretages ved afslutningen af forsøget. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofskifte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke tests afhænger af observationer af teststoffets virkning. Følgende bestemmelser kan foreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukose (fasteperioden vil afhænge af dyrearten), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), ornitin decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering, omfatter lipidanalyser, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseaktivitet. Der kan anvendes yderligere klinisk-biokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

d) Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger.

Hvis historiske basaldata er inadækvate, skal man gøre sig overvejelser over anvendelsen af hæmatologiske og klinisk biokemiske parametre, inden forsøget begynder.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflade, alle kropsåbninger og kranie-, thorax- og abdominalhulerne og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer og testikler vejes så hurtigt som muligt efter dissektion for at undgå udtørring. Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse: alle væv og organer, som udviser læsioner, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, (trakea), lunger, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, assesoriske kønskirtler, galdeblære (hvis den findes), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lårmuskulatur), perifer nerve, (øjne), (sternum med benmarv), (femur inklusive ledflade), (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt, midt for thorax og lumbalt) og (exorbitale tårekirtler).

(Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelse med målorganer.)

Histopatologiske undersøgelser

a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis.

b) Alle alvorlige læsioner skal undersøges.

c) Målorganer skal også undersøges i øvrige doserede grupper.

d) Når der anvendes rotter, undersøges lungerne fra dyrene i den lavest doserede og de middeldoserede grupper histopatologisk med henblik på konstatering af tegn på infektion, idet dette giver en egnet vurdering af dyrenes helbredstilstand. Der er ikke rutinemæssigt behov for yderligere histopatologiske undersøgelser af dyrene i disse grupper, men organer, som viser tegn på læsioner i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis, skal altid undersøges.

e) Dyrene i en eventuel satellitgruppe skal underkastes en histopatologisk undersøgelse af de væv og organer, der udviser toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration

— ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret

— oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning

— toksiske eller andre virkninger

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder og vægt

— oftalmologiske fund

— hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater

— klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.29 SUBKRONISK TOKSICITET, INHALATION

90 DAGES GENTAGEN INHALATION UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af forsøgsdyr eksponeres dagligt i en fastlagt periode for teststoffet, idet hver gruppe eksponeres for en bestemt koncentration i en periode på 90 dage. Anvendes der et vehikel til at frembringe en passende koncentration af teststoffet, bør der i forsøget indgå en kontrolgruppe, der udsættes for vehiklet alene. Dyrene observeres dagligt for toksicitetstegn. Dyr, der dør under forsøget, eller som aflives ved forsøgets slutning, obduceres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, før forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i det nødvendige antal grupper. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe en passende koncentration af teststoffet i luften. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer med henblik på at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Her kan tidligere opsamlede data benyttes.

Forsøgsbetingelser

Forsøgsdyr

Rotter er den foretrukne dyreart, medmindre der foreligger kontraindikationer. Der benyttes unge, sunde rotter af almindeligt anvendte laboratoriestammer. Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved inhalation udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Der anvendes mindst 20 dyr (ti hun- og ti handyr) til hver dosisniveau. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig eksponere en satellitgruppe på 20 dyr (ti af hvert køn) for det højeste koncentrationsniveau gennem 90 dage og observere, hvorvidt virkninger i en periode på 28 dage efter forsøget er reversible, persisterende eller optræder forsinket.

Ekspositionskoncentrationer

Der skal anvendes mindst tre forskellige koncentrationsniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikel kontrolgruppe (svarende til den højeste koncentration af vehikel), såfremt der benyttes et vehikel. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra eksponering for teststoffet. Den højeste koncentration bør have toksisk effekt, men ikke forårsage dødelighed eller kun en meget begrænset dødelighed. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, bør den laveste koncentration overskride denne eksponering. Ideelt set bør middelkoncentrationen frembringe de mindste observerbare toksiske effekter. Hvis der anvendes mere end en middelkoncentration, bør de vælges således, at der opnås en graduering af den toksiske virkning.

I den lavt doserede og middeldoserede gruppe og i kontrolgruppen bør dødeligheden holdes på et lavt niveau for at give mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Eksponeringstid

Den daglige eksponeringsperiode er seks timer, efter at koncentrationerne i kamrene er ækvilibreret. Andre perioder kan anvendes, hvis undersøgelsen skal imødekomme særlige krav.

Udstyr

Dyrene skal testes med inhalationsapparatur, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftgennemstrømning på mindst 12 luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt eksposition sluft. Benyttes der et kammer, bør det være således indrettet, at der undgås sammenklumpning af forsøgsdyrene og sikres en så stor inhalation af teststoffet som muligt. Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil atmosfære, må dyrenes totale »volumen« ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen. Eksposition kan foregå gennem mund-næse, hovedet alene eller ved kamre til hele kroppen. Ved anvendelse af de to første muligheder opnår man, at indtagelse af teststoffet ad andre veje reduceres.

Observationsperiode

Alle dyr observeres dagligt for tegn på toksicitet under hele forsøget og under restitutionsperioden. Dødstidspunkt og toksicitetstegns optræden og forsvinden registreres.

Fremgangsmåde

Dyrene eksponeres for teststoffet dagligt i fem til syv dage om ugen i en periode på 90 dage. Eventuelle satellitgrupper beregnet til længerevarende observationer skal holdes under observation i yderligere 28 dage, efter at eksponering for teststoffet er afsluttet, således at man har mulighed for at registrere, om en toksisk virkning er reversibel eller persisterer. Temperaturen under forsøget bør holdes på 22 °C ± 3°. Under ideelle forhold skal den relative luftfugtighed holdes på mellem 30 % og 70 %, men i visse tilfælde (f.eks. ved testning af aerosoler) kan dette være praktisk uigennemførligt. Der gives hverken foder eller vand under ekspositionen.

Der anvendes et dynamisk inhalationssystem med et passende analytisk kontrolsystem til sikring af ekspositionskoncentration. Det anbefales at foretage en prøvetest for at finde frem til passende ekspositionskoncentrationer. Lufthastigheden tilpasses, således at der er ensartede forhold i hele ekspositionskammeret. Systemet bør være af en sådan beskaffenhed, at der så hurtigt som muligt opnås stabile ekspositionsbetingelser.

Der skal foretages måling og kontrol af:

a) Lufthastighed (kontinuerlig).

b) Den faktiske koncentration af teststoffet målt i vejrtrækningszonen. Koncentrationen må under den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end ± 15 % fra gennemsnitskoncentrationen. Det kan imidlertid være umuligt at opnå en sådan grad af kontrol med støvpartikler og aerosoler, og i så tilfælde kan større udsving accepteres. Koncentrationerne bør fra dag til dag holdes så konstante som muligt under hele forsøgets forløb. Under indkøring af udstyret bør der foretages analyser af partikelstørrelse for at fastslå aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering skal der foretages analyser så ofte, som det er nødvendigt for at fastslå, om partikelstørrelsen er jævnt fordelt.

c) Temperatur og luftfugtighed.

d) Under og efter eksposition foretages der systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Alle dyr inspiceres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen, og dyrene vejes en gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for

undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets afslutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgruppen. Døende dyr bør fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Alle dyr inklusive kontrolgruppen skal normalt underkastes følgende undersøgelser:

a) Oftalmologisk undersøgelse med anvendelse af et oftalmoskop eller lignende passende udstyr skal foretages inden eksposition for teststoffet og ved undersøgelsens afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men sker dette ikke, undersøges mindst den gruppe, der eksponeres for den højeste dosis og kontrolgruppen. Hvis der observeres forandringer i øjnene, bør alle dyrene undersøges.

b) Hæmatologiske undersøgelser omfattende hæmotokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocyttælling, måling af koaguleringsevne f.eks. koagulationstid, protrombintid, tromboplastintid eller blodpladetælling skal foretages ved forsøgets afslutning.

c) Klinisk-biokemisk analyse af blod skal foretages ved afslutningen af forsøget. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofskifte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke tests afhænger af observationer af teststoffets virkning. Følgende bestemmelser kan foreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukose (fasteperioden vil afhænge af dyrearten), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), ornitin, decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, blodkreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering omfatter lipidanalyser, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseaktivitet. Der kan anvendes yderligere klinisk-biokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

d) Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Hvis historiske basaldata er inadækvate, bør man gøre sig overvejelser over bestemmelse af hæmatologiske og klinisk-biokemiske parametre, inden forsøget begynder.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflade, alle kropsåbninger og kranie-, thorax- og abdominalhulerne og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer og testikler vejes så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse: alle væv og organer, som udviser læsioner, lunger, som bør udtages intakt, vejes og behandles med et passende fiksativ, således at lungestrukturen bevares (perfusion med fiksativet betragtes som en effektiv fremgangsmåde), væv fra næse og naso-farynx, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, trakea, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, (assesoriske kønskirtler), (hud), galdeblære (hvis en sådan forefindes), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lårmuskulatur), perifer nerve, (øjne), sternum med benmarv, (femur inklusive ledflade), (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt midt for thorax og lumbalt) og (exorbitale tårekirtler).

(Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelser til målorganer.)

Histopatologisk undersøgelse

a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af luftvejene og andre organer og væv fra dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der eksponeres for den højeste dosis.

b) Alle alvorlige læsioner skal undersøges.

c) Målorganer skal også undersøges i øvrige doserede grupper.

d) Lungerne fra dyrene i den lavest doserede og de middeldoserede grupper skal underkastes histopatologisk undersøgelse, eftersom dette giver en egnet vurdering af dyrenes helbredstilstand. Der er ikke rutinemæssigt behov for yderligere histopatologiske undersøgelser af dyrene i disse grupper, men organer, som viser tegn på læsioner i den gruppe, der eksponeres for den højeste dosis, skal altid undersøges.

e) Dyrene i en eventuel satellitgruppe skal underkastes en histopatologisk undersøgelse af de væv og organer, der udviser toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparatur, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes. Apparaturet til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentration og partikelstørrelse beskrives.

Ekspositionsdata: Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelser) og bør omfatte:

a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret
b) luftens temperatur og fugtighed
c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparaturet divideret med luftmængden)
d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt
e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget
f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)

— oplysning om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis

— ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning

— toksiske eller andre virkninger

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder og vægt

— oftalmologiske fund

— hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater

— klinisk-biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af restultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

———

B.30 UNDERSØGELSE AF KRONISK TOKSICITET

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af forsøgsdyr doseres normalt syv dage om ugen med teststof på passende måde. Der gives en dosis pr. gruppe i størstedelen af dyrenes levetid. Under og efter dosering med teststoffet observeres dyrene dagligt, og eventuelle tegn på toksicitet registreres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

Forsøgsbetingelser

Forsøgsdyr

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Andre dyrearter (gnavere eller ikke-gnavere) kan anvendes, hvis tidligere gennemførte undersøgelser giver grundlag herfor. Der bør benyttes unge, sunde dyr af almindeligt anvendte laboratoriestammer, og doseringen bør indledes så hurtigt som muligt, efter at dyrene er vænnet fra.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved oral indgift udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Hvis forsøgsdyrene er gnavere, anvendes mindst 40 dyr (20 hun- og 20 handyr) på hvert dosisniveau samt en kontrolgruppe. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget.

Ved benyttelse af andre dyr end gnavere kan der anvendes et mindre antal, dog mindst fire af hvert køn pr. gruppe.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer ud over kontrolgruppen. Det højeste dosisniveau bør have tydelig toksisk effekt uden dog at forårsage voldsom dødelighed.

Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk effekt overhovedet.

Middeldosis (evt. flere) bør ligge midtvejs mellem det højeste og det laveste dosisniveau.

Ved valget af dosisniveauer bør der tages hensyn til data fra tidligere toksicitetsundersøgelser.

Dyrene doseres normalt med teststoffet hver dag. Hvis stoffet administreres via drikkevandet eller med foderet, skal det være kontinuert tilgængeligt.

Kontrolgruppe

Der skal anvendes en kontrolgruppe, som på alle måder er identisk med forsøgsgrupperne bortset fra dosering med teststof.

Under særlige omstændigheder som f.eks. i inhalationsundersøgelser, hvor der benyttes aerosoler, eller hvis der benyttes en emulgator med ukendt biologisk virkning i undersøgelser med oral indgift, anvendes også en negativ kontrolgruppe. Den negative kontrolgruppe behandles som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra at den ikke eksponeres hverken for teststoffet eller vehiklet.

Administrationsmåde

De to hovedformer for administration af teststof er oral indgift og inhalation. Valget af administrationsform afhænger af teststoffets fysiske og kemiske karakteristika og den sandsynlige måde, hvorpå mennesker eksponeres for stoffet.

Der er betydelige praktiske problemer forbundet med at påføre teststoffet på huden. Hvis kronisk systemisk toksicitet er et resultat af perkutan absorption, kan dette normalt udledes af resultaterne af tests med oral indgivelse, kombineret med et kendskab til graden af perkutan absorption på grundlag af tidligere perkutane toksicitetstests.

Oral indgift

Hvis teststoffet absorberes i mave-tarmkanalen, og hvis mennesker kan udsættes for indtagelse gennem munden, anvendes oral indgift, medmindre der foreligger kontraindikationer. Dyrene indgives teststoffet med foderet, opløst i drikkevandet eller i kapsler. Den ideelle dosering er, at dyrene får indgivet teststoffet syv dage om ugen. Hvis indgift indskrænkes til fem dage om ugen, kan der ske tilbagevenden til normal, eller der kan optræde abstinenssymptomer imellem eksponeringsperioderne, hvilket kan indvirke på resultaterne og den senere vurdering. Med udgangspunkt i praktiske overvejelser kan det accepteres, at dyrene indgives teststoffet fem dage om ugen.

Inhalation

Inhalationsundersøgelser giver mere komplekse tekniske problemer end andre former for administration af teststof. I det følgende gives derfor en mere detaljeret vejledning i gennemførelse af disse undersøgelser. Man bør også være opmærksom på, at intratrakeal instillation under særlige omstændigheder kan være et egnet alternativ.

Forsøg med langtidseksposition udformes normalt på grundlag af erfaringer fra arbejdspladser, således at dyrene eksponeres fem dage om ugen seks timer dagligt, efter at koncentrationen i kammeret er ækvilibreret (intermitterende eksposition), eller der benyttes eksponering på grundlag af erfaringer fra miljøet, dvs. syv dage om ugen og 22 til 24 timer pr. dag (kontinuert eksposition) med ca. en time om dagen på et bestemt klokkeslet til fodring af dyrene og rengøring af kammeret. I begge tilfælde eksponeres dyrene normalt for fastlagte koncentrationer af teststof. En vigtig forskel mellem intermitterende og kontinuert eksponering, som man må være opmærksom på, er, at der ved den førstnævnte metode er en periode på 17 til 18 timer, hvor dyrene kan overvinde virkningerne af den daglige eksposition og en endnu længere periode i weekenderne.

Valget mellem intermitterende og kontinuert eksponering afhænger af undersøgelsens formål og den menneskelige eksponering, der simuleres. Der er imidlertid en række tekniske vanskeligheder at tage i betragtning. F.eks. kan fordelene ved kontinuert eksponering, når det drejer sig om at simulere miljøbetingelser, falde væk på grund af behovet for vanding og fodring i ekspositionsperioden og behovet for mere komplicerede (og pålidelige) teknikker til generering og kontrol af aerosoler og dampe.

Ekspositionskamre

Dyrene testes i ekspositionskamre, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftstrøm på mindst tolv luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Kontrolkamre og ekspositionskamre bør være identiske med hensyn til konstruktion og udformning, så det sikres, at ekspositionsbetingelserne er sammenlignelige på alle måder bortset fra eksponering fra teststoffet. Der holdes normalt et let undertryk i kammeret for at forhindre, at teststoffet lækker ud i det omgivende rum. Kammeret indrettes således, at der undgås trængsel mellem forsøgsdyrene. Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil rumatmosfære, må dyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen.

Der skal foretages måling og kontrol af:

I. Luftgennemstrømning: det må foretrækkes, at luftstrømmen gennem kammeret kontrolleres konstant.

II. Koncentrationen må i den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end ± 15 % af den gennemsnitlige værdi. Under hele forsøget bør koncentrationen fra dag til dag holdes så konstant som praktisk muligt.

III. Temperatur og fugtighed: ved anvendelse af gnavere holdes temperaturen på 22 (± 2° C) og fugtigheden i kammeret mellem 30 og 70 %, undtagen når der anvendes vand til suspension af teststoffet i kammerets atmosfære. Det må foretrækkes, at både temperatur og fugtighed kontrolleres konstant.

IV. Måling af partikelstørrelse: hvis der anvendes atmosfærer med flydende eller faste aerosoler i kammeret, bør der foretages en beregning af partikelstørrelsens distribution. Aerosolpartiklerne skal være respirable for de anvendte forsøgsdyr. Der tages prøver af kammerets atmosfære i dyrenes vejrtrækningszone. Luftprøverne skal være repræsentative for den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, og det skal gennem gravimetrisk analyse være muligt på grundlag af disse luftprøver at beskrive hele aerosolen, også selv om meget af den ikke er respirabel. Under indkøring af udstyret bør der foretages hyppige analyser af partikelstørrelsen for at sikre aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering foretages analyser så ofte, som det er nødvendigt for en adækvat bestemmelse af, om den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, er konstant.

Undersøgelsens varighed

Ekspositionen bør vare i mindst tolv måneder.

Fremgangsmåde

Observation

Der foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst en gang om dagen. Herudover bør dyrene med jævne mellemrum inspiceres for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen. Det vil sige, døde dyr obduceres eller nedfryses, og svage eller døende dyr isoleres eller aflives. Der foretages omhyggelig registrering af alle tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, og hvor længe de varer, og det sikres, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af sygdomme, autolyse af væv eller kannibalisme.

Hos alle dyr foretages registrering af kliniske symptomer, herunder neurologiske forandringer, forandringer i øjne og mortalitet. Toksicitetstegns optræden og udvikling og mistanke om forekomst af tumorer skal registreres.

Dyrene vejes enkeltvis en gang om ugen i de første 13 uger af forsøgsperioden og mindst en gang hver fjerde uge derefter. Foderindtagelse bestemmes en gang om ugen i de første 13 uger og derefter ca. hver tredje måned, medmindre andet indiceres af helbredstilstanden eller ændringer i legemsvægten.

Hæmatologisk undersøgelse

Hæmatologisk undersøgelse (f.eks. hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, erytrocyttælling, total leukocyttælling, blodpladetælling og målinger af koaguleringsevnen) udføres efter tre måneder, seks måneder og derefter ca. hver sjette måned samt ved forsøgets afslutning på blodprøver, som ved andre dyr end gnavere tages på hvert enkelt dyr og på rotter på ti dyr pr. køn i alle grupper. Hvis det er muligt, bør prøverne tages fra de samme rotter hver gang. Fra andre dyr end gnavere bør der tages en prøve, inden forsøget påbegyndes.

Hvis kliniske observationer tyder på, at dyrenes helbredstilstand er blevet dårligere under forsøget, foretages en differential tælling på prøver fra de pågældende dyr.

Der foretages en differential tælling på prøver fra dyr i den gruppe, som har været eksponeret for den højeste dosis og fra dyr i kontrolgruppen. Der udføres kun differential tælling på prøver fra dyr i den gruppe, der har fået den næsthøjeste dosis, hvis der er stor forskel på den højest doserede gruppe og kontrolgruppen, eller hvis den patologiske undersøgelse indicerer det.

Urinanalyse

Der indsamles urinprøver til analyse fra alle andre dyr end gnavere og fra ti rotter pr. køn i alle grupper om muligt fra de samme rotter hver gang med samme intervaller som de ovenfor nævnte blodprøver. Følgende undersøgelser gennemføres på prøver enten fra enkelte dyr eller for rotters vedkommende på en samlet urinprøve/køn/gruppe:

— udseende: rumfang og vægtfylde for hvert enkelt dyr

— protein, glukose, ketonstof, hæmaturi (semikvantitativt), og

— sedimentmikroskopi (semikvantitativt).

Klinisk-kemisk undersøgelse

Der udtages blodprøver til klinisk-kemisk undersøgelse med ca. seks måneders mellemrum under forsøget og ved forsøgets afslutning fra hvert enkelt dyr, såfremt det drejer sig om andre arter end gnavere, og fra ti rotter/køn i alle grupper så vidt muligt fra de samme rotter hver gang. Fra andre dyr end gnavere skal der tages en prøve, inden forsøget påbegyndes. Plasma fra prøverne underkastes følgende undersøgelser:

— total serumprotein

— albumin

— leverfunktionsundersøgelser (f.eks. alkalisk fosfataseaktivitet, serum alanin aminotransferase (ALAT) og serum aspartat aminotransferase (ASAT)), gamma glutamyl transpeptidase, ornitin decarboxylase

— kulhydratstofskifte, f.eks. fasteglukose

— nyrefunktionsundersøgelser f.eks. urinstof.

Makroskopisk undersøgelse

Alle dyr inklusive de dyr, som er døde under forsøget, eller som blev aflivet, fordi de var døende, underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Før aflivning tages blodprøver af alle dyr til differential tælling. Alle makroskopisk synlige læsioner, tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, opbevares. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

Alle væv og organer bør opbevares med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Det drejer sig normalt om følgende væv og organer: hjerne [1] (medulla/pons, det cerebellare og cerebrale cortex), hypofyse, skjoldbruskkirtel (inklusive biskjoldbruskkirtel), thymusvæv, lunger (inklusive trakea), hjerte, aorta, spytkirtler, lever [1], milt, nyrer [1], binyrer [1], spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, uterus, urinblære, lymfeknuder, bygspytkirtel, kønskirtler [1], assesoriske kønskirtler, kvindelig brystkirtel, hud, muskulatur, perifer nerve, rygmarv (cervikalt, thorakalt, lumbalt), sternum med benmarv og femur (inklusive led) og øjne. Den optimale præparering af lunger og urinblærer er inflation med et fiksativ og i forbindelse med inhalationsundersøgelser er det centralt for de histopatologiske undersøgelser, at lungerne inflateres. I særlige undersøgelser som inhalationsundersøgelser bør de samlede luftveje undersøges, herunder næse, farynx og larynx.

Hvis der gennemføres andre kliniske undersøgelser, bør resultaterne af disse foreligge, før der foretages mikroskopiske undersøgelser, fordi de kan være af afgørende værdi for patologen.

Histopatologisk undersøgelse

Alle makroskopisk synlige forandringer af et hvilket som helst organ, især tumorer og andre læsioner, skal undersøges mikroskopisk. Det anbefales yderligere at foretage:

a) Mikroskopisk undersøgelse af alle præparerede organer og væv med fuldstændig beskrivelse af alle fundne læsioner hos

   1. alle dyr, som er døde eller aflivet under forsøget, og

   2. alle dyr fra den gruppe, der er blevet eksponeret for den højeste dosis og kontrolgruppen.

b) Organer eller væv, som udviser abnormiteter, der skyldes eller kan skyldes teststoffet, undersøges også hos de lavere doserede grupper.

c) Såfremt forsøgsresultaterne viser betydelige ændringer i dyrenes normale levetid eller induktioner af effekter, der kan have betydning for en toksisk respons, undersøges den gruppe, der eksponeres for den næsthøjeste dosis, efter ovenstående retningslinier.

d) En korrekt vurdering af betydningen af de forandringer, der observeres hos de eksponerede dyr, forudsætter kendskab til den normalt forekommende incidens af læsioner i den anvendte dyrestamme (under samme laboratoriebetingelser, dvs. på grundlag af tidligere opsamlede data).

[1] Disse organer udtages og vejes fra ti dyr pr. køn pr. gruppe, når det drejer sig om gnavere og fra alle andre dyr end gnavere. For andre dyrearter end gnavere tages desuden skjoldbruskkirtel (med biskjoldbruskkirtel), som også vejes.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparatur, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådan benyttes. Apparatur til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentration og partikelstørrelse beskrives.

Ekspositionsdata:

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelser) og bør omfatte:

a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret

b) luftens temperatur og fugtighed

c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparaturet divideret med luftmængden)

d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt

e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget

f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)

— dosisniveauer (inklusive vehikel, hvor et sådant er anvendt) og koncentrationer

— oplysning om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis

— minimal virkningsfuld dosis

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning

— beskrivelse af toksiske eller andre virkninger

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder og vægt

— oftalmologiske fund

— hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater

— klinisk-biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.31 TERATOGENECITETSUNDERSØGELSE I GNAVERE OG IKKE-GNAVERE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Principper for testmetoden

Flere grupper af drægtige forsøgsdyr indgives dagligt teststoffet i forskellige doser eller koncentrationer, idet der anvendes en bestemt koncentration eller dosis til hver enkelt gruppe i mindst den del af drægtighedsperioden, der dækker organogenesen. Kort før det forventede fødselstidspunkt aflives moderdyret, uterus fjernes, og indholdet undersøges. Denne metode dækker embryo- og føtotoksicitet.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Unge, sunde udvoksede hundyr, som ikke har været parret, og som er af ca. samme alder og størrelse, akklimatiseres laboratoriebetingelserne i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Dyrene parres med handyr, hvis frugtbarhed på forhånd er vurderet, og fordeles randomiseret i grupper. Parringen kan foregå naturligt eller ved kunstig inseminering.

Hundyrene indgives dagligt teststoffet straks efter implantationen og videre gennem hele organogenesen. En dag før det forventede fødetidspunkt udtages fostrene ved hysterektomi, og de undersøges for abnormiteter i organer eller skelet, herunder ratarderet vækst, forsinket ossificering og intestinale hæmorragier.

Forsøgsbetingelser

Forsøgsdyr

De almindeligst anvendte forsøgsdyr er rotter, mus, hamstre og kaniner. De foretrukne arter er rotten og kaninen. Der benyttes almindeligt anvendte laboratoriestammer. Stammen bør ikke have en lav fertilitet, og den bør være kendt for at reagere på teratogener. Dyrene holdes i hvert sit bur.

Antal og køn

Der anvendes mindst 20 drægtige rotter, mus eller hamstre eller tolv drægtige kaniner til hver dosisniveau. Formålet er at sikre, at der kommer tilstrækkelig mange kuld og unger, til af teststoffets teratogene potentiale kan vurderes.

Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, bør der også være en vehikelkontrolgruppe. Et eventuelt vehikels toksikologiske egenskaber bør være kendt, og det må ikke være teratogent eller påvirke reproduktionen. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne bortset fra indgivelse at teststoffet. Medmindre der er begrænsninger som følge af teststoffets

fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage en vis umiddelbar konstaterbar toksicitet hos moderdyret såsom let vægttab, men ikke mere end 10 % dødsfald blandt moderdyrene. Den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt. Middeldosis (evt. flere) gradueres geometrisk mellem den største og den mindste dosis.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres embryonal toksicitet eller teratogenicitet ved en dosis på 1 000 mg/kg af et stof med lav toksicitet, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

Eksponeringstid

Forsøgets dag 0 er den dag, hvor man (for så vidt det er muligt) observerer en vaginalprop og/eller sperma. Eksponeringsperioden bør dække den centrale organogenese. Det vil sige omkring dag 6 til 15 for rotter og mus, dag 6 til 14 for hamstre og dag 6 til 18 for kaniner. Hvis dag 0 fastlægges på grundlag af parringen eller kunstig inseminering, bør de oplyste perioder justeres ved addering af en dag. Alternativt kan doseringsperioden udstrækkes til ca. en dag før det forventede fødetidspunkt.

Observationsperiode

Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst en gang om dagen. Herudover bør dyrene med jævne mellemrum observeres med henblik på, at færrest mulige dyr tabes for undersøgelsen.

Fremgangsmåde

Teststoffet indgives oralt med mavesonde.

Stoffet skal indgives på ca. samme tidspunkt hver dag.

Forsøgsdyrene behandles med teststoffet hver dag i den fastlagte doseringsperiode. Dosis kan baseres på vægten af hundyrene ved doseringsperiodens begyndelse, eller man kan under hensyntagen til den hurtige vægtforøgelse i drægtighedsperioden veje dyrene regelmæssigt og basere dosis på den senest registrerede vægt. Det registreres, hvornår toksicitetstegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Dyr, der viser symptomer på abort eller for tidlig fødsel, aflives og underkastes en grundig makroskopisk vurdering. Observationen fortsættes efter doseringsperioden indtil ca. en dag før det beregnede fødselstidspunkt. Formålet er at dække det meste af drægtighedsperioden, men at undgå de fortolkningsmæssige komplikationer, der kan forekomme i forbindelse med en naturlig fødsel. Observationerne skal omfatte men ikke nødvendigvis begrænses til forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelse. Dyrene vejes en gang om ugen.

Makroskopisk undersøgelse

Moderdyr, som dør under forsøget, og dyr, der aflives efter forsøget, underkastes en makroskopisk vurdering med registrering af alle strukturelle abnormiteter eller patologiske ændringer, der kan have haft indflydelse på drægtigheden. Straks efter at dyret er dødt, fjernes uterus, og indholdet undersøges med henblik på konstatering af eventuelle døde fostre på det embryonale stade eller senere stadier og antallet af levende fostre. Hvis der er tale om dødsfald in utero, er det normalt muligt at vurdere dødstidspunktet. Hos rotter og kaniner kan antallet af corpora lutea fastlægges. Fostrenes køn bestemmes, og de vejes individuelt, vægten noteres, og fostrenes middelvægt beregnes. Efter udtagning undersøges hvert enkelt foster eksternt. Hos rotter, mus og hamstre præpareres mellem en tredjedel og halvdelen af hvert kuld, og præparaterne undersøges for skeletabnormiteter, mens den tiloversblevne del af hvert kuld præpareres og undersøges for bløddelsabnormiteter under anvendelse af egnede metoder. Kaninfostre undersøges individuelt ved omhyggelig dissektion med henblik på konstatering af organabnormiteter, og undersøges derefter for skeletabnormiteter.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr, som blev drægtige, absolut og procentvist antal levende fostre og fostre med bløddels- eller skeletabnormiteter og deres tilhørsforhold til det enkelte kuld. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentrationer

— oplysning om toksisk reaktion inddelt efter dosis

— ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning

— toksiske eller andre virkninger

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder og vægt

— drægtighedens varighed og oplysninger om de enkelte kuld (inklusive historiske data)

— oplysninger om fostrene (levende/dødt, køn, bløddels- og skeletdefekter)

— oplysninger om de enkelte kuld (levende/dødt, køn, bløddels- og skeletdefekter for hvert enkelt kuld)

— statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vudering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.32 KARCINOGENICITETSUNDERSØGELSE

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af forsøgsdyr doseres normalt syv dage om ugen med teststof på passende måde. Der gives en dosis pr. gruppe i størstedelen af dyrenes levetid. Under og efter dosering med teststoffet observeres dyrene dagligt, og eventuelle tegn på toksicitet, især udvikling af tumorer, registreres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

Forsøgsdyr

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Andre dyrearter (gnavere eller ikke-gnavere) kan anvendes, hvis tidligere gennemførte undersøgelser giver grundlag herfor. Der bør benyttes unge, sunde dyr af almindeligt anvendte laboratoriestammer, og doseringen bør indledes så hurtigt som muligt, efter at dyrene er vænnet fra.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet ved oral indgift udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Hvis der anvendes gnavere, skal der anvendes mindst 100 dyr (50 hun- og 50 handyr) til hvert dosisniveau samt en kontrolgruppe. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer ud over kontrolgruppen. Det højeste dosisniveau bør fremkalde minimale toksicitetstegn f.eks. en let formindskelse af legemsvægten (mindre end 10 %), uden at der er tale om væsentlige ændringer af den normale levetid undtagen som følge af tumorer.

Den mindste dosis bør ikke påvirke dyrenes normale vækst, udvikling og levetid eller have nogen toksisk effekt overhovedet. I almindelighed bør denne dosis ikke være mindre end 10 % af den største dosis.

Middeldosis (evt. flere) bør ligge midtvejs mellem det højeste og laveste dosisniveau.

Ved valg af dosisstørrelser bør der tages hensyn til data fra tidligere toksicitetsundersøgelser.

Dyrene doseres normalt med teststoffet hver dag.

Hvis stoffet administreres via drikkevandet eller med foderet, bør det være kontinuert tilgængeligt.

Kontrolgruppe

Der skal anvendes en kontrolgruppe, som på alle måder er identisk med forsøgsgrupperne bortset fra dosering med teststoffet.

Under særlige omstændigheder som f.eks. inhalationsundersøgelser, hvor der benyttes aerosoler, eller hvis der benyttes en emulgator med ukendt biologisk virkning i undersøgelser med oral indgift, anvendes en negativ kontrolgruppe, som ikke doseres hverken med teststoffet eller vehiklet.

Administrationsmåde

De tre hovedformer for administration af teststof er oral indgift, påføring på huden og inhalation. Valget af administrationsform afhænger af teststoffets fysiske og kemiske karakteristika og den sandsynlige måde, hvorpå mennesker ekponeres for stoffet.

Oral indgift

Hvis teststoffet absorberes i mave-tarmkanalen, og hvis mennesker kan udsættes for indtagelse gennem munden, anvendes oral indgift, medmindre der foreligger kontraindikationer. Dyrene indgives teststoffet med foderet, opløst i drikkevandet eller i kapsler.

Den ideelle dosering er, at dyrene får indgivet teststoffet, syv dage om ugen. Hvis indgift indskrænkes til fem dage om ugen, kan der ske tilbagevenden til normal, eller der kan optræde abstinenssymptomer imellem eksponeringsperioderne, hvilket kan indvirke på resultaterne og den senere vurdering. Med udgangspunkt i praktiske overvejelser kan det accepteres, at dyrene indgives teststoffet fem dage om ugen.

Påføring på huden

Kutan påføring ved hudpensling kan vælges som model ved induktion af hudlæsioner med henblik på at simulere en vigtig human ekspositionsform.

Inhalation

Inhalationsundersøgelser giver mere komplekse tekniske problemer end andre former for administrering af teststof, i det følgende gives derfor en mere detaljeret vejledning i gennemførelse af disse undersøgelser. Man bør også være opmærksom på, at intratrakeal instillation under særlige omstændigheder kan være et egnet alternativ.

Forsøg med langtidseksposition udformes normalt på grundlag af erfaringer fra arbejdspladser, således at dyrene eksponeres fem dage om ugen seks timer dagligt, efter at koncentrationen i kammeret er ækvilibreret (intermitterende eksposition), eller der benyttes eksponering på grundlag af erfaringer fra miljøet, dvs. syv dage om ugen og 22 til 24 timer pr. dag (kontinuert eksposition) med ca. en time om dagen på et bestemt klokkeslæt til fodring af dyrene og rengøring af kammeret. I begge tilfælde eksponeres dyrene normalt for fastlagte koncentrationer af teststof. En vigtig forskel mellem intermitterende og kontinuert eksposition, som man må være opmærksom på, er, at der ved den førstnævnte metode er en periode på 17 til 18 timer, hvor dyrene kan overvinde virkningerne af en daglige eksposition og en endnu længere periode i weekenderne.

Valget mellem intermitterende og kontinuert eksposition, afhænger af undersøgelsens formål og den menneskelige eksponering, der simuleres. Der er imidlertid en række tekniske vanskeligheder at tage i betragtning. F.eks. kan fordelene ved kontinuert eksponering, når det drejer sig om at simulere miljøbetingelser, falde væk på grund af behovet for vanding og fodring i ekspositionsperioden og for mere komplicerede (og pålidelige) teknikker til generering og kontrol af aerosoler og dampe.

Ekspositionskamre

Dyrene testes i ekspositionskamre, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftgennemstrømning på mindst tolv luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Kontrolkamre og ekspositionskamre bør være identiske med hensyn til konstruktion og udformning, så det sikres, at ekspositionsbetingelserne er sammenlignelige på alle måder bortset fra eksponering

for teststoffet. Der holdes normalt et let undertryk i kammeret for at forhindre, at teststoffet lækker ud i det omgivende rum. Kammeret indrettes, således at der undgås trængsel mellem forsøgsdyrene.

Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil rumatmosfære, må dyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen.

Der skal foretages måling og kontrol af:

I. Luftgennemstrømning: det må foretrækkes, at luftstrømmen gennem kammeret kontrolleres kontinuerligt.

II. Koncentrationen må i den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end ± 15 % af den gennemsnitlige værdi.

Under hele forsøget skal koncentrationen fra dag til dag holdes så konstant som praktisk muligt.

III. Temperatur og fugtighed: ved anvendelse af gnavere holdes temperaturen på 22 (± 2° C) og fugtigheden i kammeret mellem 30 og 70 %, undtagen når der anvendes vand til suspension af teststof i kammerets atmosfære. Det må foretrækkes, at både temperatur og fugtighed kontrolleres konstant.

IV. Måling af partikelstørrelse: hvis der anvendes atmosfære med flydende eller faste aerosoler i kammeret, bør der foretages en beregning af partikelstørrelsens distribution. Aerosolpartiklerne skal være respirable for de anvendte forsøgsdyr. Der tages prøver af kammerets atmosfære i dyrenes vejrtrækningszone. Luftprøverne skal være repræsentative for den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, og det skal gennem gravimetrisk analyse være muligt på grundlag af disse luftprøver at beskrive hele aerosolen, også selv om meget af den ikke er respirabel. Under indkøring af udstyret bør der foretages hyppige analyser af partikelstørrelsen for at sikre aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering foretages analyser så ofte, som det er nødvendigt for en adækvat bestemmelse af, om den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, er konstant.

Undersøgelsens varighed

En karcinogenicitetsundersøgelse omfatter størstedelen af forsøgsdyrenes normale levetid. Hvis der anvendes mus og hamstre bør forsøget vare 18 måneder, og hvis der anvendes rotter, 24 måneder. Ved anvendelse af visse dyrestammer med længere levetid og/eller en lav spontan tumorincidens bør forsøget vare 24 måneder med mus og hamstre og 30 måneder med rotter. Det kan dog accepteres, at en sådan forlænget undersøgelse afsluttes, når antallet af overlevende dyr i den gruppe, der eksponeres for den mindste dosis, eller kontrolgruppen er nede på 25 %. Hvis der er en åbenlys forskel i respons afhængig af dyrenes køn, bør hvert køn betragtes som et forsøg for sig, og forsøgets længde indrettes herefter. Hvis der kun optræder præmature dødsfald i den gruppe, som eksponeres for den højeste dosis, og hvis dette klart skyldes toksiske effekter, er det ikke nødvendigt at afslutte undersøgelsen, under forudsætning af at de toksiske effekter ikke skaber problemer i de andre grupper. Hvis et negativt testresultat skal kunne accepteres, må højst 10 % af hver gruppe falde uden for undersøgelsen på grund af autolyse af væv, kannibalisme eller forveksling, og overlevelsesprocenten i alle grupper må ikke være under 50 % efter 18 måneders forløb med anvendelse af mus og hamstre og 24 måneder med anvendelse af rotter.

Fremgangsmåde

Observation

Observation af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret.

Dyrene inspiceres regelmæssigt for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Døende dyr fjernes og obduceres, når de observeres.

For alle dyrs vedkommende registreres kliniske symptomer og mortalitet. Der foretages en nøje registrering af udviklingen af tumorer. Ved alle makroskopisk synlige eller palpable tumorer registreres symptomer, lokalisering, dimensioner, fremtræden og udvikling.

Foderindtagelse (og vandforbrug, hvis teststof indgives med drikkevandet) bestemmes en gang om ugen i de første 13 uger og derefter ca. hver tredje måned, medmindre andet indiceres af helbredstilstanden eller ændringer i legemsvægten.

Dyrene vejes enkeltvis en gang om ugen i de første 13 uger af forsøgsperioden og mindst en gang hver fjerde uge derefter.

Klinisk undersøgelse

Hæmatologisk undersøgelse

Hvis observationer af dyrene tyder på, at deres helbredstilstand er blevet dårligere under forsøget, foretages en differential tælling på blodprøver fra de pågældende dyr.

Efter hhv. 12 og 18 måneders varighed samt umiddelbart før aflivning tages blod fra hvert enkelt dyr til udstrygningspræparater. Der foretages en differential tælling på prøver fra dyrene i den gruppe, som har været doseret med den højeste dosis, og fra dyrene i kontrolgruppen. Hvis resultaterne af disse analyser, især af de prøver, som tages umiddelbart inden aflivning, eller resultaterne af den patologiske undersøgelse indicerer det, udføres differential tælling på prøver fra dyr i den gruppe, der har fået den næsthøjeste dosis.

Makroskopisk undersøgelse

Alle dyr inklusive de dyr, som er døde under forsøget, eller som blev aflivet, fordi de var døende, underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Alle makroskopisk synlige tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, opbevares.

Følgende væv og organer opbevares i et passende medium med henblik på senere histopatologisk undersøgelse: hjerne, (herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex), hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, trakea, lunger, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, assesoriske kønskirtler, hud, spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, kvindelig brystkirtel, lårmuskulatur, perifer nerve, sternum med benmarv, femur (inklusive ledflade), rygmarv i tre snit (cervikalt, midt for thorax og lumbalt) samt øjne.

Den optimale præparering af lunger og urinblære er inflation med et fiksativ. I forbindelse med inhalationsundersøgelser er det centralt for de histopatologiske undersøgelser, at lungerne inflateres. I inhalationsundersøgelser bør de samlede luftveje undersøges, herunder næse, farynx og larynx.

Histopatologisk undersøgelse

a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra dyr, som dør eller aflives under forsøget, samt dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der er blevet doseret med den højeste dosis.

b) Alle makroskopisk synlige tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, undersøges i alle grupper.

c) Hvis der er signifikant forskel på de neoplastiske læsioners incidens i den højest doserede gruppe og kontrolgruppen, skal de relevante organer eller væv undersøges histopatologisk i de øvrige grupper.

d) Hvis overlevelse i den højest doserede gruppe er væsentlig lavere end i kontrolgruppen, underkastes den gruppe, der er doseret med den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.

e) Hvis undersøgelsen af den højest doserede gruppe giver grund til at formode, at der er tale om induktion af toksiske eller andre effekter, som kan have betydning for et neoplastisk respons, underkastes den gruppe, der eksponeres for den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med tumorer, som er registreret under forsøget, registreringstidspunkt og antal dyr, hos hvem der er fundet tumorer efter aflivning. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparatur, herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes. Apparatur til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentration og partikelstørrelse beskrives.

Ekspositionsdata:

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelser) og bør omfatte:

a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret

b) luftens temperatur og fugtighed

c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparaturet divideret med luftmængden)

d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt

e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget

f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)

— doser (inklusive vehikel, hvor et sådant er anvendt) og koncentrationer

— oplysning om tumorincidens inddelt efter køn, dosis og tumortype

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning

— oplysning om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis

— toksisk eller anden virkning

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder og vægt

— resultaterne af de hæmatologiske analyser

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— statistisk behandling af resultaterne og beskrivelse af den anvendte metoder

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.33 KOMBINERET UNDERSØGELSE AF KARCINOGENICITET/KRONISK TOKSICITET

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Formålet med en kombineret undersøgelse af kronisk toksicitet/karcinogenicitet er at bestemme et stofs kroniske og karcinogene virkninger på pattedyr efter langvarig eksponering.

Med henblik herpå, suppleres karcinogenicitetsundersøgelsen med mindst en satellitgruppe, der eksponeres for teststoffet, og en kontrolsatellitgruppe. Den dosis, som den højst doserede satellitgruppe eksponeres for, kan være større end den største dosis, der anvendes i karcinogenicitetsundersøgelsen. Dyrene i karcinogenicitetsundersøgelsen undersøges både for toksisk respons og for karcinogen respons. Dyrene i den eksponerede satellitgruppe undersøges for toksisk respons.

Flere grupper af forsøgsdyr doseres normalt syv dage om ugen med teststof på passende måde. Der gives en dosis pr. gruppe i størstedelen af dyrenes levetid. Under og efter doseringen af teststoffet observeres dyrene dagligt, og eventuelle tegn på toksicitet og udvikling af tumorer registreres.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper.

Forsøgsdyr

Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Andre dyrearter (gnavere eller ikke-gnavere) kan anvendes, hvis tidligere gennemførte undersøgelser giver grundlag herfor. Der bør benyttes unge, sunde dyr af almindeligt anvendte laboratoriestammer, og doseringen bør indledes så hurtigt som muligt, efter at dyrene er vænnet fra.

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % af gennemsnitsvægten. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

Antal og køn

Hvis der anvendes gnavere, skal der anvendes mindst 100 dyr (50 hun- og 50 handyr) til hvert dosisniveau samt en kontrolgruppe. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget.

Den (de) doserede satellitgruppe(r), der anvendes til bedømmelse af andre patologiske virkninger end tumorer, skal omfatte 20 dyr af hvert køn, mens kontrolsatellitgruppen skal omfatte ti dyr af hvert køn.

Dosisniveauer

Til testning af karcinogenicitet anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer udover kontrolgruppen. Det højeste dosisniveau bør fremkalde minimale toksicitetstegn f.eks. en let formindskelse af legemsvægten (mindre end 10%), uden at der er tale om væsentlige ændringer af den normale levetid undtagen som følge af tumorer.

Den mindste dosis bør ikke påvirke dyrenes normale vækst, udvikling og levetid eller have nogen toksisk effekt overhovedet. I almindelighed bør denne dosis ikke være mindre end 10% af den største dosis.

Middeldosis (evt. flere) bør ligge midtvejs mellem det højeste og laveste dosisniveau.

Ved valg af dosisstørrelser bør der tages hensyn til data fra tidligere toksicitetsundersøgelser.

Med henblik på testning af kronisk toksicitet inkluderes flere forsøgsgrupper og en dertil hørende kontrolsatellitgruppe i undersøgelsen. Den højeste dosis, som dyrene i satellitgrupperne eksponeres for, bør være så høj, at den giver tydelige tegn på toksicitet.

Dyrene doseres normalt med teststoffet hver dag.

Hvis stoffet administreres via drikkevandet eller med foderet, bør det være kontinuert tilgængeligt.

Kontrolgruppe

Der skal anvendes en kontrolgruppe, som på alle måder er identisk med forsøgsgrupperne bortset fra dosering med teststoffet.

Under særlige omstændigheder som f.eks. inhalationsundersøgelser, hvor der benyttes aerosoler, eller hvis der benyttes en emulgator med ukendt biologisk virkning i undersøgelser med oral indgift, anvendes en negativ kontrolgruppe, som ikke doseres hverken med teststoffet eller vehiklet.

Administrationsmåde

De tre hovedformer for administration af teststof er oral indgift, påføring på huden og inhalation. Valget af administrationsform afhænger af teststoffets fysiske og kemiske karakteristika og den sandsynlige måde, hvorpå mennesker eksponeres for stoffet.

Oral indgift

Hvis teststoffet absorberes i mave-tarmkanalen, og hvis mennesker kan udsættes for indtagelse gennem munden, anvendes oral indgift, medmindre der foreligger kontraindikationer. Dyrene indgives teststoffet med foderet, opløst i drikkevandet eller i kapsler.

Den ideelle dosering er, at dyrene får indgivet teststoffet syv dage om ugen. Hvis indgift indskrænkes til fem dage om ugen, kan der ske tilbagevenden til normal, eller der kan optræde abstinenssymptomer imellem eksponeringsperioderne, hvilket kan indvirke på resultaterne og den senere vurdering. Med udgangspunkt i praktiske overvejelser, kan det accepteres, at dyrene indgives teststoffet fem dage om ugen.

Påføring på huden

Kutan påføring ved hudpensling kan vælges som model ved induktion af hudlæsioner med henblik på at simulere en vigtig human ekspositionsform.

Inhalation

Inhalationsundersøgelser giver mere komplekse tekniske problemer end andre former for administrering af teststof. I det følgende gives derfor en mere detaljeret vejledning i gennemførelse af disse undersøgelser. Man bør også være opmærksom på, at intratrakeal instillation under særlige omstændigheder kan være et egnet alternativ.

Forsøg med langtidseksposition udformes normalt på grundlag af erfaringer fra arbejdspladser, således at dyrene eksponeres fem dage om ugen seks timer dagligt, efter at koncentrationen i kammeret er ækvilibreret (intermitterende eksposition), eller der benyttes eksponering på grundlag af erfaringer fra miljøet, dvs. syv dage om ugen og 22 til 24 timer pr. dag (kontinuert eksposition) med ca. en time om dagen på et bestemt klokkeslæt til fodring af dyrene og rengøring af kammeret. I begge tilfælde eksponeres dyrene normalt for fastlagte koncentrationer af teststof. En vigtig forskel mellem intermitterende og kontinuert eksposition, som man må være opmærksom på, er, at der ved den førstnævnte metode er en periode på 17 til 18 timer, hvor dyrene kan overvinde virkningerne af den daglige eksposition og en endnu længere periode i weekenderne.

Valget mellem intermitterende og kontinuert eksposition afhænger af undersøgelsens formål og den menneskelige eksponering, der simuleres. Der er imidlertid en række tekniske vanskeligheder at tage i betragtning. F.eks. kan fordelene ved kontinuert eksponering, når det drejer sig om at simulere miljøbetingelser, falde væk på grund af behovet for vanding og fodring i ekspositionsperioden og for mere komplicerede (og pålidelige) teknikker til generering og kontrol af aerosoler og dampe.

Ekspositionskamre

Dyrene testes i ekspositionskamre, der er således udformet, at der kan opretholdes en dynamisk luftgennemstrømning på mindst tolv luftskift pr. time, samtidig med at der sikres et adækvat iltindhold og en jævnt fordelt ekspositionsluft. Kontrolkamre og ekspositionskamre bør være identisk med hensyn til konstruktion og udformning, så det sikres, at ekspositionsbetingelserne er sammenlignelige på alle måder bortset fra eksponering for teststoffet. Der holdes normalt et let undertryk i kammeret for at forhindre, at teststoffet lækker ud i det omgivende rum. Kammeret indrettes, således at der undgås trængsel mellem forsøgsdyrene. Den generelle regel er, at hvis der skal sikres en stabil rumatmosfære, må dyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af ekspositionskammerets volumen.

Der skal foretages måling og kontrol af:

I. Luftgennemstrømning: det må foretrækkes, at luftstrømmen gennem kammeret kontrolleres kontinuerligt.

II. Koncentrationen må i den daglige eksponeringsperiode ikke variere mere end ± 15 % af den gennemsnitlige værdi.

Under hele forsøget skal koncentrationen fra dag til dag holdes så konstant som praktisk muligt.

III. Temperatur og fugtighed: ved anvendelse af gnavere holdes temperaturen på 22 (± 2° C) og fugtigheden i kammeret mellem 30 og 70 % undtagen når der anvendes vand til suspension af teststof i kammerets atmosfære. Det må foretrækkes, at både temperatur og fugtighed kontrolleres konstant.

IV. Måling af partikelstørrelse: hvis der anvendes atmosfærer med flydende eller faste aerosoler i kammeret, bør der foretages en beregning af partikelstørrelsens distribution. Aerosolpartiklerne skal være respirable for de anvendte forsøgsdyr. Der tages prøver af kammerets atmosfære i dyrenes vejrtrækningszone. Luftprøverne skal være repræsentative for den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, og det skal gennem gravimetrisk analyse være muligt på grundlag af disse luftprøver at beskrive hele aerosolen, også selv om meget af den ikke er respirabel. Under indkøring af udstyret bør der foretages hyppige analyser af partiklernes størrelse for at sikre aerosolkoncentrationernes stabilitet. Under eksponering foretages analyser, så ofte som det er nødvendigt for en adækvat bestemmelse af, om den partikeldistribution, dyrene eksponeres for, er konstant.

Undersøgelsens varighed

Varigheden af den del af undersøgelsen, der drejer sig om karcinogenicitet, omfatter størstedelen af forsøgsdyrenes normale levetid. Hvis der anvendes mus og hamstre, bør forsøget vare 18 måneder, og hvis der anvendes rotter 24 måneder. Ved anvendelse af visse dyrestammer med længere levetid og/eller en lav spontan tumorincidens, bør forsøget vare 24 måneder med mus og hamstre og 30 måneder med rotter. Det kan dog accepteres, at en sådan forlænget undersøgelse afsluttes, når antallet af overlevende dyr i den gruppe, der doseres på det laveste dosisniveau, eller kontrolgruppen er nede på 25 %. Hvis der er åbenlys forskel i respons afhængig af dyrenes køn, bør hvert køn betragtes som et forsøg for sig, og forsøgets varighed indrettes herefter. Hvis der kun optræder præmature dødsfald i den gruppe, som doseres på det højeste dosisniveau, og hvis dette klart skyldes toksiske effekter, er det ikke nødvendigt at afslutte undersøgelsen, under forudsætning af at de toksiske effekter ikke skaber problemer i de andre grupper. Hvis et negativt testresultat skal kunne accepteres, må højst 10 % af hver gruppe falde uden for undersøgelsen på grund af autolyse af væv, kannibalisme eller forveksling, og overlevelsesprocenten i alle grupper må ikke være under 50 % efter 18 måneders forløb ved anvendelse af mus og hamstre og 24 måneder ved anvendelse af rotter.

Satellitgrupperne, som består af 20 doserede dyr pr. køn og en kontrolgruppe på ti dyr pr. køn, og som anvendes til undersøgelse af kronisk toksicitet, holdes under forsøgsbetingelser i mindst tolv måneder. Tidspunktet for aflivning af disse dyr bør fastsættes ud fra en vurdering af patologiske fund relateret til teststof, og således at eventuelle geriatriske forandringer ikke griber forstyrrende ind.

Fremgangsmåde

Observationer

Dyrene inspiceres dagligt for forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønster.

Dyrene i den (de) doserede satellitgruppe(r) skal undersøges klinisk med passende mellemrum.

Dyrene inspiceres regelmæssigt for at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Døende dyr fjernes og obduceres, når de observeres.

Kliniske symptomer, herunder neurologiske forandringer og forandringer i øjne samt mortalitet, registreres for alle dyr. Der foretages en nøje registrering af udviklingen af tumorer. De første symptomer og udvikling af toksicitetstegn registreres. Ved alle makroskopisk synlige eller palpable tumorer registreres de første symptomer, lokalisering, dimension, fremtræden og udvikling. Foderindtagelse (og vandforbrug, hvis teststoffet indgives via drikkevandet) bestemmes en gang ugen i de første 13 uger og derefter ca. hver tredje måned, medmindre andet indiceres af helbredstilstanden eller ændringer i legemsvægten.

Dyrene vejes enkeltvis en gang om ugen i de første 13 uger af forsøgsperioden, og mindst en gang hver fjerde uge derefter.

Kliniske undersøgelser

Hæmatologisk undersøgelse

Hæmatologisk undersøgelse (f.eks. hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, erytrocyttælling, total leukocyttælling, blodpladetælling og målinger af koaguleringsevnen) udføres efter tre måneder, seks måneder og derefter ca. hver sjette måned samt ved forsøgets afslutning på blodprøver fra ti rotter pr. køn i alle grupper. Hvis det er muligt, skal prøverne tages fra de samme rotter hver gang.

Hvis kliniske observationer af dyrene tyder på, at deres helbredstilstand er blevet dårligere under forsøget, foretages en differential tælling på prøver fra de pågældende dyr. Der foretages en differential tælling på prøver fra dyrene i den gruppe, som har været doseret med den højeste dosis, og fra dyrene i kontrolgruppen. Der udføres kun differential tælling på prøver fra dyrene i den gruppe, der har fået den næsthøjeste dosis, hvis der er stor forskel på den højest doserede gruppe og kontrolgruppen, eller hvis den patologiske undersøgelse indicerer det.

Urinanalyse

Der indsamles urinprøver til analyse fra ti rotter pr. køn i alle grupper om muligt fra de samme rotter hver gang og med samme intervaller som de ovenfor nævnte blodprøver. Følgende undersøgelser gennemføres på prøver enten fra enkelte dyr eller for rotters vedkommende på en samlet urinprøve/køn/gruppe:

— udseende: rumfang og vægtfylde for hvert enkelt dyr

— protein, glukose, ketonstof, hæmaturi (semikvantitativt), og

— sedimentmikroskopi (semikvantitativt).

Klinisk-kemisk undersøgelse

Der udtages blodprøver til klinisk-kemisk undersøgelse med ca. seks måneders mellemrum og ved forsøgets afslutning fra hvert enkelt dyr, såfremt det drejer sig om andre arter end gnavere, og fra ti rotter/køn i alle grupper så vidt muligt fra de samme rotter hver gang. Fra andre dyr end gnavere skal der tages en prøve inden forsøget påbegyndes. Plasma fra prøverne underkastes følgende undersøgelser:

— total serumprotein

— albumin

— leverfunktionsundersøgelser (f.eks. alkalisk fosfataseaktivitet, serum alanin aninotransferase (ALAT) og serum aspartat aminotransferase (ASAT)), gamma glutamyl transpeptidase, ornitin decarboxylase

— kulhydratstofskifte f.eks. fasteglukose

— nyrefunktionsundersøgelser f.eks. urinstof.

Makroskopisk undersøgelse

Alle dyr inklusive de dyr, som er døde under forsøget, eller som blev aflivet, fordi de var døende, underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering. Før aflivning tages blodprøver af alle dyr til differential tælling. Alle makroskopisk synlige læsioner, tumorer, som mistænkes for at være tumorer, opbevares. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

Alle væv og organer bør opbevares med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Det drejer sig normalt om følgende væv og organer: hjerne (1) (medulla/pons, det cerebellare og cerebrale cortex), hypofyse, skjoldbruskkirtel (inklusive biskjoldbruskkirtel), thymusvæv, lunger (inklusive trakea), hjerte, aorta, spytkirtler, lever (1), milt, nyrer (1), binyrer (1), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, uterus, urinblære, lymfeknuder, bugspytkirtel, kønskirtler (1), assesoriske kønskirtler, kvindelig brystkirtel, hud, muskulatur, perifer nerve, rygmarv (cervikalt, thorakalt, lumbalt), sternum med benmarv og femur (inklusive led) og øjne. Den optimale præparering af lunger og urinblære er inflation med et fiksativ, og i forbindelse med inhalationsundersøgelser er det centralt for de histopatologiske undersøgelser, at lungerne inflateres. I særlige undersøgelser som inhalationsundersøgelser bør de samlede luftveje undersøges, herunder næse, farynx og larynx.

Hvis der gennemføres andre kliniske undersøgelser, bør resultaterne af disse foreligge, før der foretages mikroskopiske undersøgelser, fordi de kan være af afgørende værdi for patologen.

Histopatologisk undersøgelse

For den del af undersøgelsen, der drejer sig om kronisk toksicitet

Der bør foretages en detaljeret undersøgelse af alle opbevarede organer fra dyr i den højest doserede satellitgrupe og kontrolgruppen. Hvis der findes patologiske tegn, som kan relateres til teststoffet i den højest doserede satellitgruppe, underkastes målorganerne hos dyrene i de øvrige doserede satellitgrupper samt de doserede grupper i den del af undersøgelsen, der drejer sig om karcinogenicitet, en fuldstændig og detaljeret histologisk undersøgelse ved forsøgets afslutning.

For den del af undersøgelsen, der drejer sig om karcinogenicitet

a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra de dyr, som dør eller aflives under forsøget, samt dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der er blevet doseret med den højeste dosis.

b) Alle makroskopisk synlige tumorer eller læsioner, som mistænkes for at være tumorer, undersøges.

c) Hvis der er signifikant forskel på de neoplastiske læsioners incidens i den højest doserede gruppe og kontrolgrupper, skal de relevante organer og væv undersøges histopatologisk i de øvrige grupper.

d) Hvis overlevende i den højest doserede gruppe er væsentlig lavere end i kontrolgruppen, underkastes den gruppe, der er doseret med den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.

e) Hvis undersøgelsen af den højest doserede gruppe giver grund til at formode, at der er tale om induktion af toksiske eller andre effekter, som kan have betydning for et neoplastisk respons, underkastes den gruppe, der eksponeres for den næsthøjeste dosis, en fuldstændig histopatologisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med tumorer eller toksisk reaktion, som er registreret under forsøget, registreringstidspunkt og antal dyr, hos hvem der er fundet tumorer efter aflivning. Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

(1) Disse organer udtages og vejes fra ti dyr pr. køn pr. gruppe, når det drejer sig om gnavere.

— forsøgsbetingelser:

Beskrivelse af ekspositionsapparatur,

herunder udformning, type, dimensionering, luftkilde, system til frembringelse af partikler og aerosoler, metode til konditionering af luften, behandling af udpumpet luft og den måde, hvorpå dyrene holdes i et ekspositionskammer, når et sådant benyttes. Apparatur til måling af temperatur, fugtighed og eventuelle partikulære aerosolers koncentrationer og partikelstørrelse beskrives.

Ekspositionsdata:

Disse skal opstilles i tabelform og angive middelværdier og variation (f.eks. standardafvigelser) og bør omfatte:

a) lufthastighed gennem inhalationsudstyret

b) luftens temperatur og fugtighed

c) nominelle koncentrationer (total mængde teststof tilført inhalationsapparaturet divideret med luftmængden)

d) type af vehikel, hvor et sådant er anvendt

e) faktiske koncentrationer i opholdsarealet under forsøget

f) middelværdien af partikelstørrelser (hvor dette er relevant)

— dosisniveauer (inklusive vehikel, hvor et sådant er anvendt) og koncentrationer

— oplysning om tumorincidens inddelt efter køn, dosis og tumortype

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning, inklusive satellitgruppen

— oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis

— toksisk eller anden virkning

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— oftalmologiske fund

— data for foder og vægt

— hæmatologiske analyser og samtlige resultater

— resultaterne af de klinisk-biokemiske analyser (herunder urinanalyse)

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— statistisk behandling af resultaterne og beskrivelse af den anvendte metode

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.34 REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I EN GENERATION

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af han- og hundyr doseres med teststoffet, idet der gives en dosis pr. gruppe. Handyr doseres under væksten og under mindst en fuldstændig spermiedannelsescyklus (ca. 56 dage for mus og 70 dage for rotter) med henblik på at fremkalde sundhedsmæssige uønskede virkninger, teststoffet måtte have på spermatogenesen.

Hundyr i F_0-generationen doseres i mindst to fuldstændige østrale perioder for at fremkalde de skadelige virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på brunsten. Derefter parres dyrene. Begge køn doseres med teststof i parringsperioden, og derefter doseres kun hundyrene i drægtighedsperioden og laktationsperioden.

Hvis dosering med teststof foregår ved inhalation, kræves ændringer af metoden.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i grupper. Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Det anbefales, at teststoffet administreres med foderet eller drikkevandet. Andre former for administration kan også accepteres. Alle dyr skal doseres på samme måde i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Dyrene skal doseres med teststoffet syv dage om ugen.

Forsøgsdyr

Valg af dyreart

Rotten eller musen er de foretrukne forsøgsdyr. Stammen bør ikke have en lav fertilitet. Der benyttes sunde dyr, som ikke tidligere har været anvendt i forsøg. Forsøgsdyrene bør være velbeskrevne med hensyn til art, stamme, køn, vægt og/eller alder.

For at få en adækvat vurdering af fertilitet skal både han- og hundyr undersøges. Alle dyr i forsøgsgrupper og kontrolgrupper skal være fravænnet, før dosering påbegyndes.

Antal og køn

Hver enkelt forsøgs- og kontrolgruppe skal indeholde tilstrækkelig mange dyr, til at der kan findes ca. 20 drægtige hundyr, som er nær ved eller på fødetidspunktet.

Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom, til at der kan foretages en meningsfuld vurdering af teststoffets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd i F_0-generationen samt dieadfærd, vækst og udvikling i F_1-generationen fra undfangelse til dyrene er vænnet fra.

Forsøgsbetingelser

Foder og vand gives ad libitum. Når fødetidspunktet nærmer sig, placeres de drægtige hundyr i hvert sit bur, idet der benyttes fødebure eller yngelbure, og dyrene kan eventuelt forsynes med materiale til redebygning.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Hvis et teststof fører til formindsket foderindtagelse eller interfererer med absorption og stofskifte, kan det være nødvendigt at anvende en kontrolgruppe, som er matchet med hensyn til foder. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage toksisk virkning, men ikke dødsfald i forældre (F_0)-generationen. Middeldosis (evt. flere) bør fremkalde de mindste konstaterbare toksiske virkninger af teststoffet, og den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt hverken på forældregenerationen eller afkommet. Hvis stoffet indgives med mavesonde eller i kapsel, bør den dosis, som hvert enkelt dyr modtager, udregnes på grundlag af dyrets legemsvægt og ugentligt tilpasses ændringer i denne legemsvægt. Dosering af drægtige hundyr kan baseres på legemsvægten på dag 0 eller 6, hvis man ønsker det.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres nogen virkning på reproduktionen ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg af et lavtoksisk stof, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Hvis en indledende undersøgelse, hvor kun den højeste dosis benyttes, klart viser toksisk virkning på moderdyret, men ikke har nogen skadelig virkning på fertiliteten, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

Fremgangsmåde

Forsøgsplan

Daglig dosering af forældre (F_0)-generationen indledes, når dyrene er mellem fem og ni uger gamle, og efter at de er vænnet fra og akklimatiseret i mindst fem dage. Hvis der anvendes rotter, fortsættes doseringen i ti uger før parringsperioden (ved mus otte uger). Handyrene skal enten aflives og undersøges efter parringsperioden, eller man kan fortsætte med at indgive dem teststoffet frem til en mulig produktion af et andet kuld, hvorefter de aflives og undersøges, et stykke tid før undersøgelsen afsluttes. Dosering af forældregenerationens hundyr indledes efter mindst fem dages akklimatisering og fortsætter mindst to uger før parring. Daglig dosering af F_0-hundyrene fortsættes gennem den tre uger lange parringsperiode, drægtighedsperioden og op til F_1-generationen er vænnet fra. Man bør overveje eventuelle ændringer i forsøgsplanen, hvis der foreligger informationer om teststoffet fra specielle stofskifteundersøgelser eller undersøgelse af akkumulation.

Parring

Der kan anvendes parring i forholdet 1:1 (et handyr og et hundyr) eller 1:2 (et handyr og to hundyr) i undersøgelser af reproduktionstoksicitet.

Anvendes 1:1 parring, anbringes et hundyr med et handyr, indtil der indtræder drægtighed, eller tre uger er gået. Hver morgen undersøges hundyrene for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 fastlægges under hensyntagen til spermatogenesen som den dag, hvor der observeres vaginalprop eller sperma.

De par, som ikke parrer sig, bør undersøges for fastlæggelse af årsagen til den tilsyneladende ufrugtbarhed. Dette kan gøres ved, at dyrene f.eks. får lejlighed til at parre sig med han- eller hundyr, hvis frugtbarhed er påvist, ved mikroskopisk undersøgelse af reproduktionsorganerne og ved undersøgelse af den østrale periode eller spermatogenesen.

Kuldstørrelse

De dyr, som doseres i fertilitetsundersøgelsen, bør have lov til at yngle normalt og pleje deres afkom frem til afvænning uden standardisering.

Hvis der gennemføres standardisering, foreslås følgende fremgangsmåde. Mellem dag 1 og 4 efter fødslen, standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes, således at hvert kuld kommer så tæt som muligt på at bestå af fire handyr og fire hundyr.

Hvis det på grund af antallet af han- og hundyr ikke er muligt at standardisere hvert kuld, så det indeholder fire af hvert køn, kan delvis standardisering accepteres (f.eks. fem handyr og tre hundyr). Der foretages ikke standardisering af kuld på mindre end otte unger.

Observation

Dyrene inspiceres mindst en gang om dagen under hele forsøget. Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn herunder mortalitet, registreres. Før og under parringsperioden registreres foderindtagelsen ugentligt. I drægtighedsperioden kan foderindtagelsen (og vandindtagelsen, hvis teststoffet administreres heri) registreres dagligt. Efter fødslen og i dieperioden måles foderindtagelsen på de samme dage, som kuldene vejes. Han- og hundyr af F_0-generationen vejes den dag, doseringen indledes og derefter en gang om ugen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert enkelt udvokset dyr.

Drægtighedsperioden beregnes fra dag 0. Hvert kuld undersøges så hurtigt som muligt efter fødslen for at fastslå ungernes antal og køn, antal dødfødte og levendefødte og forekomst af makroskopisk synlige abnormiteter.

Døde unger og unger, som aflives på dag 4, skal opbevares og undersøges for mulige defekter. Levende unger tælles, og kuldet vejes morgenen efter fødslen, på dag 4 og dag 7, og derefter en gang om ugen indtil undersøgelsens afslutning, hvor dyrene skal vejes individuelt. Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter, som observeres hos hundyrene eller afkommet skal registreres.

Patologisk undersøgelse

Makroskopisk undersøgelse

F_0-generationsdyr, som aflives efter eller dør under forsøget, undersøges makroskopisk med henblik på konstatering af strukturelle abnormiteter eller patologiske forandringer, idet opmærksomheden særlig rettes mod reproduktionssystemet. Døde eller døende unger undersøges for defekter.

Histopatologisk undersøgelse

Ovarier, uterus, cervix, vagina, testikler, bitestikler, sædblærer, prostata, accessoriske kønskirtler, hypofyse og målorgan(er) fra alle dyr i F_0-generationen præpareres med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Skulle det undtagelsesvist forekomme, at disse organer endnu ikke har været underkastet undersøgelse i andre forsøg med multipel dosering, undersøges organerne fra dyrene i den gruppe, der har modtaget den højeste dosis, og i kontrolgruppen samt de dyr, som er døde under forsøget, mikroskopisk, hvis det er praktisk muligt.

Hvis der konstateres abnormiteter i organer fra disse dyr, undersøges disse organer også hos alle andre dyr i F_0-generationen. Der foretages i så fald mikroskopisk undersøgelse af alle væv, som udviser makroskopisk patologiske forandringer. Som anført i afsnittet parring kan reproduktionsorganerne fra dyr, som formodes at være ufrugtbare, også underkastes mikroskopisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal frugtbare handyr, antal drægtige hundyr, typer af forandringer og den procentdel dyr, som udviser hver enkelt type forandring. Evaluering af resultaterne baseres så vidt muligt på en passende statistisk metode. Enhver anerkendt statistisk metode kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— anvendt dyreart/stamme

— oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og afkommets levedygtighed

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning eller planlagt aflivningstidspunkt

— tabel med angivelse af vægten af hvert enkelt kuld, ungernes gennemsnitlige vægt og hver enkelt unges vægt ved forsøgets afslutning

— toksisk eller anden virkning på reproduktion, afkom, postnatal vækst

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder- og legemsvægt for F_0-generationen

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle mikroskopiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.35 REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I TO GENERATIONER

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Flere grupper af han- og hundyr doseres med teststoffet, idet der gives en dosis pr. gruppe. F_0-generationens handyr doseres under væksten og under mindst en fuldstændig spermiedannelsescyklus (ca. 56 dage for mus og 70 dage for rotter) med henblik på at fremkalde sundhedsmæssige uønskede virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på spermatogenesen. Hundyrene i F_0-generationen doseres i mindst to fuldstændige østrale perioder med henblik på at fremkalde de skadelige virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på brunsten. Når F_1-generationen er fravænnet, doseres den med teststoffet gennem hele væksten, parringsperioden og produktionen af en F_2-generation, frem til F_2-generationen er fravænnet. Hvis dosering for teststof foregår ved inhalation kræves ændringer af metoden.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Sunde dyr fordeles randomiseret i test- og kontrolgrupper. Dyrene i forældre (F_0)-generationen holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Det anbefales, at teststoffet administreres med foderet eller drikkevandet. Andre former for administrering kan også accepteres. Alle dyr skal doseres på samme måde i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, bør det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Dyrene skal doseres for teststoffet syv dage om ugen.

Forsøgsdyr: Valg af dyreart

Rotten eller musen er de foretrukne forsøgsdyr. Stammen bør ikke have en lav fertilitet. Til F_0-generationen benyttes sunde dyr, som ikke tidligere har været anvendt i forsøg. Forsøgsdyrene bør være velbeskrevne med hensyn til art, stamme, køn, vægt og/eller alder.

For at få en adækvat vurdering af fertilitet skal både han- og hundyr undersøges. Alle dyr i forsøgsgrupper og kontrolgrupper skal være fravænnet, før dosering påbegyndes.

Antal og køn

Hver enkelt forsøgs- og kontrolgruppe skal indeholde tilstrækkelig mange dyr, til at der kan findes ca. 20 drægtige hundyr, som er nær ved eller på fødetidspunktet. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom, til at der kan foretages en meningsfuld vurdering af teststoffets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed

og moderdyrenes adfærd samt adfærd, vækst og udvikling i F_1-generationen fra undfangelse til fuldt udvokset og udviklingen af F_2-generationen, frem til dyrene er vænnet fra.

Forsøgsbetingelser

Foder og vand gives ad libitum. Når fødetidspunktet nærmer sig, placeres de drægtige hundyr i hvert sit bur, idet der benyttes fødebure eller yngelbure, og dyrene kan eventuelt forsynes med materiale til redebygning.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Hvis et teststof fører til formindsket foderindtagelse eller interfererer med absorption og stofskifte, kan det være nødvendigt at anvende en kontrolgruppe, som er matchet med hensyn til foder. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage toksisk virkning, men ikke dødsfald i forældre (F_0)-generationen. Middeldosis (evt. flere) bør fremkalde de laveste konstaterbare toksiske virkninger af teststoffet, og den mindste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt hverken på forældre (F_0)-generationen eller afkommet. Hvis stoffet indgives med mavesonde eller i kapsel, bør den dosis, som hvert enkelt dyr modtager, udregnes på grundlag af dyrets legemsvægt og ugentligt tilpasses ændringer i denne legemsvægt. Dosering af drægtige hundyr kan baseres på legemsvægten på dag 0 eller 6, hvis man ønsker det.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres nogen virkning på reproduktionen ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg af et lavtoksisk stof, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Hvis en indledene undersøgelse, hvor kun den højeste dosis benyttes, klart viser toksisk virkning på moderdyret, men ikke har nogen skadelige virkning på fertiliteten, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

Fremgangsmåde

Forsøgsplan

Daglig dosering af forældre (F_0)-generationen indledes, når dyrene er mellem fem og ni uger gamle, og efter at de er vænnet fra og akklimatiseret i mindst fem dage. Hvis der anvendes rotter, fortsætter eksponeringen i ti uger før parringsperioden (ved mus otte uger). Handyrene skal enten aflives og undersøges efter parringsperioden, eller man kan fortsætte med at indgive dem teststoffet frem til en mulig produktion af et andet kuld, hvorefter de aflives og undersøges, et stykke tid før undersøgelsen afsluttes.

Dosering af forældre (F_0)-generationens hundyr påbegyndes efter mindst fem dages akklimatisering og fortsætter mindst to uger før parring. Daglig dosering af F_0-hundyrene fortsættes gennem den tre uger lange parringsperiode, drægtighedsperioden og op til F_1-generationen er fravænnet. Man bør overveje eventuelle ændringer i forsøgsplanen, hvis der foreligger informationer om teststoffet fra specielle stofskifteundersøgelser eller undersøgelse af akkumulation.

Dosering af F_1-generationen indledes, når den er vænnet fra, og fortsættes, til dyrene aflives.

Parring

Der kan anvendes parring i forholdet 1:1 (et handyr og et hundyr) eller 1:2 (et handyr og to hundyr) i undersøgelse af reproduktionstoksicitet. Anvendes 1:1 parring, anbringes et hundyr med et handyr, indtil der indtræder drægtighed, eller tre uger er gået. Hver morgen undersøges hundyrene for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 fastlægges til den dag, hvor der observeres vaginalprop eller sperma.

Under hensyntagen til spermatogenesen bør F_1-generationen ikke parres, før dyrene er mindst 11 uger gamle, hvis det drejer sig om mus, og 13 uger, hvis det drejer sig om rotter. Ved parring af F_1-generationen udvælges et handyr og et hundyr tilfældigt fra hvert kuld og krydses med et dyr fra et andet kuld inden for samme forsøgsgruppe med henblik på produktion af F_2-generationen. Den han- og hundyr fra F_1-generationen, som ikke udvælges til parring, aflives, når de er fravænnet.

De par, som ikke parrer sig, bør undersøges for fastlæggelse af årsagen til den tilsyneladende ufrugtbarhed. Dette kan gøres, ved at dyrene f.eks. får lejlighed til at parre sig med han- eller hundyr, hvis frugtbarhed er påvist, ved mikroskopisk undersøgelse af reproduktionsorganerne og ved undersøgelse af den østrale periode eller spermatogenesen.

Kuldstørrelse

De dyr, som doseres i fertilitetsundersøgelsen, bør have lov at yngle normalt og pleje deres afkom frem til afvænning uden standardisering.

Hvis der gennemføres standardisering foreslås følgende fremgangsmåde. Mellem dag 1 og 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes, således at hvert kuld kommer så tæt på som muligt på at bestå af fire handyr og fire hundyr. Hvis det på grund af antallet af han- og hundyr ikke er muligt at standardisere hvert kuld, så at det indeholder fire af hvert køn, kan delvis standardisering accepteres (f.eks. fem handyr og tre hundyr). Der foretages ikke standardisering af kuld på mindre end otte unger. F_2-generationens kuld standardiseres på samme måde.

Observation

Dyrene inspiceres mindst en gang om dagen under hele forsøget. Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn herunder mortalitet, registreres. Før og under parringsperioden registreres foderindtagelsen ugentligt. I drægtighedsperioden kan foderindtagelsen registreres dagligt. Efter fødslen og i dieperioden måles foderindtagelsen på de samme dage, som kuldene vejes. Forældregenerationsdyr (F_0 og F_1) vejes, den dag doseringen indledes, og derefter en gang om ugen. Disse observationer bør rapporteres individuelt for hvert enkelt udvokset dyr.

Drægtighedsperioden beregnes fra dag 0. Hvert kuld undersøges så hurtigt som muligt efter fødslen for at fastslå ungernes antal og køn, antal dødfødte og levendefødte og forekomsten af makroskopisk synlige abnormiteter. Døde unger og unger, som aflives på dag 4, opbevares og undersøges for mulige defekter.

Levende unger tælles, og kuldet vejes morgenen efter fødslen, på dag 4 og dag 7 og derefter en gang om ugen indtil undersøgelsens afslutning, hvor dyrene skal vejes individuelt. Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter, som observeres hos hundyrene eller afkommet, skal registreres.

Patologisk undersøgelse

Makroskopisk vurdering

Dyrene i F_0- og F_1-generationerne aflives, så snart de ikke længere er nødvendige for undersøgelsen af reproduktionen. Afkom i F_1-generationen, som ikke udvælges til parring, samt alt afkom i F_2-generationen aflives, når de er fravænnet.

F_0- og F_1-generationsdyr, som aflives efter eller dør under forsøget, undersøges mikroskopisk for konstatering af strukturelle abnormiteter eller patologiske forandringer, idet opmærksomheden særlig rettes mod reproduktionssystemet. Døde eller døende unger skal undersøges for defekter.

Histopatologisk undersøgelse

Ovarier, uterus, cervix, vagina, testikler, bitestikler, sædblærer, prostata, accessoriske kønskirtler, hypofyse og målorgan(er) fra alle dyr i F_0- og F_1-generationerne præpareres om nødvendigt med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Skulle det undtagelsesvist forekomme, at disse organer endnu ikke har været underkastet undersøgelse i andre forsøg med multipel dosering, undersøges de mikroskopisk hos dyrene i den gruppe, der har modtaget den højeste dosis og i kontrolgruppen i F_0-generationen og de F_1-dyr, der udvælges til parring samt hos de dyr, som er døde under forsøget, hvis det er praktisk muligt.

Hvis der konstateres abnormiteter i organer fra disse dyr, undersøges disse organer også hos alle andre dyr i de øvrige forsøgsgrupper. Der foretages i så fald mikroskopisk undersøgelse af alle væv, som udviser makroskopisk patologiske forandringer. Som anført i afsnittet parring kan reproduktionsorganerne fra de dyr, som formodes at være ufrugtbare, også underkastes mikroskopisk undersøgelse.

2. DATA

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal drægtige dyr, typer af forandringer og den procentdel dyr, som udviser hver enkelt type forandring. Evaluering af resultaterne baseres så vidt muligt på en passende statistisk metode. Enhver anerkendt statistisk metode kan anvendes.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— anvendt dyreart/stamme

— oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og afkommets levedygtighed

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning

— tabel med angivelse af vægten af hvert enkelt kuld, ungernes gennemsnitlige vægt og hver enkelt unges vægt ved forsøgets afslutning

— toksisk eller anden virkning på reproduktion, afkom, postnatal vækst

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder- og legemsvægt for F_0-generationen og de F_1-dyr, der udvælges til parring

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle mikroskopiske fund, såfremt der foretages mikroskopisk undersøgelse

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. Vurdering og fortolkning

Se den generelle indledning til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se den generelle indledning til afsnit B.

B.36 TOKSIKOKINETIK

1. METODE

1.1. Indledning

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.3. Referencestoffer

Ingen.

1.4. Princip for testmetoden

Teststoffet indgives på passende måde. Afhængigt af undersøgelsens formål kan teststoffet gives på en gang eller ad flere gange fordelt over fastlagte perioder, og der kan benyttes en eller flere grupper af forsøgsdyr. Afhængigt af undersøgelsens art foretages derefter bestemmelse af teststoffet og/eller dets metabolitter i kropsvæsker, væv og/eller excreta. Ved undersøgelsen kan anvendes både »mærket« og »umærket« teststof. Hvis der benyttes mærkning, skal denne være i en sådan position i teststoffet, at det giver flest muligt oplysninger om teststoffets omdannelse i organismen.

1.5. Kvalitetskriterier

Ingen.

1.6. Beskrivelse af testmetoden

Forberedelser

Sunde, unge, voksne dyr akklimatiseres til laboratoriets undersøgelsesbetingelser i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Forud for undersøgelsen randomiseres dyrene og fordeles i grupper. Under særlige omstændigheder kan der anvendes ganske unge, drægtige eller forbehandlede dyr.

Forsøgsbetingelser

Forsøgsdyr

Ved toksikokinetiske undersøgelser kan anvendes en eller flere egnede dyrearter, og der må tages hensyn til, hvilke dyrearter man har brugt eller har til hensigt at bruge i andre toksikologiske undersøgelser af det samme teststof. Hvis der anvendes gnavere, må dyrenes vægt ved undersøgelsens begyndelse ikke variere mere end ± 20 % af gennemsnitsvægten.

Antal og køn

Ved undersøgelse af optagelse og udskillelse anvendes fire dyr til hver dosis ved forsøgets begyndelse. Der stilles ikke krav vedrørende dyrenes køn — det kan dog under visse omstændigheder være nødvendigt at anvende begge køn. Hvis der er tale om kønsbetingede forskelle i teststoffets virkning, anvendes fire dyr af hvert køn. I forsøg med andre dyr end gnavere kan der benyttes et mindre antal dyr.

Ved undersøgelse af fordelingen i væv fastlægges den størrelse, forsøgsgrupperne skal have ved forsøgets begyndelse, under hensyntagen til både hvor mange dyr, der skal aflives på forud fastlagte tidspunkter, og hvor mange sådanne tidspunkter forsøget skal omfatte.

Ved undersøgelse af metabolismen fastlægges gruppestørrelsen efter behov.

Ved undersøgelse med flere doser og flere tidsafhængige delundersøgelser fastlægges gruppestørrelsen under hensyntagen til påregnet aflivning og antal undersøgelsestidspunkter, idet der dog ikke må anvendes mindre end to dyr pr. gruppe. Grupperne skal være tilstrækkeligt store til at muliggøre en acceptabel beskrivelse af absorption, koncentrationsniveauer og udskillelsesforhold for teststoffet og/eller dets metabolitter.

Dosisniveauer

Når teststoffet gives på en gang anvendes mindst to forskellige doser. Der anvendes en lav dosis, hvor der ikke observeres nogen toksisk effekt, og en høj dosis hvor der kan være tale om ændringer i de toksikokinetiske parametre eller om toksiske effekter.

Hvis teststoffet indgives gentagne gange, er det normalt tilstrækkeligt at anvende den lave dosis, men under visse omstændigheder kan det være nødvendigt også at anvende en høj dosis.

Administrationsmåde

Ved toksikokinetiske undersøgelser indgives teststoffet på samme måde og om muligt under anvendelse af samme vehikel som i allerede foretagne eller planlagte toksikologiske undersøgelser af samme teststof. Sædvanligvis indgives teststoffet enten oralt med mavesonde eller via foderet, ved påføring på huden eller ved inhalation i på forhånd fastlagte tidsrum. Intravenøs indgift kan være nyttig ved bestemmelse af den relative absorption ved andre administrationsmåder. Dertil kommer, at der kan tilvejebringes nyttige oplysninger om fordelingsmønstret kort tid efter intravenøs indgift.

Der bør tages hensyn til muligheden for, at vehiklet interfererer med teststoffet. Samtidig må man være opmærksom på, at der kan være forskelle i absorptionen afhængigt af, om teststoffet indgives med mavesonde eller via foderet, og at der derfor er behov for en nøjagtig bestemmelse af størrelsen af dosis, især når teststoffet indgives via foderet.

Observationsperiode

Alle dyr observeres dagligt og toksicitetstegn og andre relevante kliniske symptomer registreres, idet det blandt andet registreres, hvornår de optræder første gang, hvor alvorlige de er, og hvor længe de varer.

Fremgangsmåde

Dyrene vejes, og teststoffet indgives under anvendelse af en passende administreringsform.

Absorption

Den mængde af det indgivne stof, der optages, og den hastighed, hvormed optagelsen foregår, kan vurderes ved hjælp af forskellige metoder med og uden referencegrupper [1], f.eks.:

— bestemmelse af mængden af teststof og/eller metabolitter i excreta som urin, galde, fæces og udåndingsluft og den tilbageværende mængde i kroppen efter aflivning

— sammenligning af biologisk respons (f.eks. i undersøgelser af akut toksicitet) i forsøgs-, kontrol- og/eller referencegrupper

— sammenligning af mængden af teststof og/eller metabolitter, som udskilles gennem nyrerne i forsøgs- og referencegrupperne

— bestemmelse af arealet under kurven over plasmakoncentrationen af teststoffet og/eller dets metabolitter som funktion af tiden og sammenligning med data fra en referencegruppe.

[1] I den her beskrevne metode forstås ved referencegruppe en gruppe, som indgives teststoffet under anvendelse af en anden administreringsform, som sikrer, at hele dosis kan optages.

Fordeling

Der er i dag mulighed for at analysere fordelingsmønstrene på to måder, og man kan benytte den ene eller begge fremgangsmåder:

— der kan tilvejebringes nyttige kvalitative oplysninger ved anvendelse af helkropsautoradiografiske teknikker

— kvantitative oplysninger tilvejebringes ved aflivning af dyr på forskellige tidspunkter efter eksponeringen og fastlæggelse af mængden og koncentrationen af teststof og/eller metabolitter i væv og -organer.

Udskillelse

Ved undersøgelse af udskillelsen opsamles urin, fæces og udåndingsluft samt i visse tilfælde galde. Mængden af teststof og/eller metabolitter i disse excreta måles på flere tidspunkter efter eksponeringen, indtil ca. 95 % af dosis er udskilt, dog højst i syv dage.

I specielle tilfælde kan det være nødvendigt at tage hensyn til udskillelse af teststof i mælken fra diegivende forsøgsdyr.

Metabolisme

Biologiske prøver analyseres under anvendelse af dertil egnede metoder med henblik på at bestemme metabolismens omfang og mønster. Hvor der er behov for at besvare spørgsmål som følge af tidligere toksikologiske undersøgelser, opklares metabolitternes struktur, og der fremsættes forslag til beskrivelse af sandsynlige metabolismeveje. Undersøgelser in vitro kan være en hjælp til fremskaffelse af oplysninger om metabolismens forløb.

Yderligere oplysninger om sammenhængen mellem metabolisme og toksisk effekt kan indhentes gennem biokemiske undersøgelser ved f.eks. at bestemme virkningen på metaboliserende enzymsystemer, reduktion i mængden af endogene non-protein sulfhydrylforbindelser og teststoffets binding til makromolekyler.

2. DATA

Data opstilles i tabelform og støttes, når det er muligt, af grafiske fremstillinger, alt afhængigt af undersøgelsestypen. Når det er muligt, anføres middelværdi og statistisk variation af alle målinger i relation til tid, doser, væv og organer for samtlige forsøgsgruppers vedkommende. Den absorberede og udskilte mængde samt udskillelseshastigheden bestemmes med dertil egnede metoder. Ved metabolismeundersøgelser oplyses de identificerede metabolitters struktur, og sandsynlige metabolismeveje fremlægges.

3. RAPPORTERING

3.1. Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder

— beskrivelse af mærkede stoffer, når sådanne er anvendt

— dosisniveauer og anvendte intervaller

— administrationsmåde og eventuelle vehikler

— toksisk og anden virkning

— metoder til bestemmelse af teststof og/eller metabolitter i biologiske prøver, herunder udåndingsluft

— måleresultater opstillet i tabelform efter køn, doser, andre testparametre, tid, væv og organer

— den absorberede og udskilte mængde som en funktion af tiden

— metoder til karakterisering og identificering af metabolitter i biologiske prøver

— biokemiske målemetoder anvendt i forbindelse med metabolisme

— forslag til metabolismeveje

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. **Vurdering og fortolkning**

Se de generelle oplysninger til afsnit B.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Se de generelle oplysninger til afsnit B.

»B.37 FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER EFTER AKUT EKSPONERING

1. METODE

1.1. Indledning

Ved vurdering af stoffers toksiske virkninger er det vigtigt at undersøge visse stofgruppers mulighed for at fremkalde specifikke former for neurotoksicitet, som i givet fald ikke kan påvises i andre toksicitetsundersøgelser. Visse organiske phosphorforbindelser har vist sig at forårsage forsinket neurotoksicitet og bør undersøges med henblik herpå.

Der kan anvendes in vitro-screeningtests til identificering af stoffer, som kan forårsage forsinket polyneuropati; negative resultater af in vitro-undersøgelser kan imidlertid ikke bruges som dokumentation for, at teststoffet ikke er neurotoksisk.

Se den generelle indledning til afsnit B.

1.2. Definitioner

Organiske phosphorforbindelser omfatter uladede estere, thioestere og anhydrider af organiske phosphorsyrer, phosphonsyrer og phosphoramidsyrer eller tilsvarende phosphosthiosyrer, phosphonthiosyrer og phosphorthioamidsyrer eller andre stoffer, der kan forårsage den forsinkede neurotoksicitet, der til tider forekommer for denne stofgruppe.

Forsinket neurotoksicitet er et syndrom, der er knyttet til langvarig, forsinket opståen af ataxi, distal axonopati i rygmarv og perifere nerver og inhibition og aldring af neurotoksisk esterase (NTE) i nervevæv.

1.3. Referencestoffer

Et referencestof kan testes med en positiv kontrolgruppe som middel til at påvise, at den undersøgte arts reaktion ikke har ændret sig signifikant under laboratorieforsøgsbetingelserne.

Et eksempel på et meget anvendt neurotoksisk stof er tri-o-tolylphosphat (CAS-nr. 78-30-8, EINECS-nr. 201-103-5, CAS-nomenklatur: phosphorsyre, tris(2-methylphenyl)ester), også kendt som tris-o-cresylphosphat.

1.4. Testmetodens princip

Teststoffet indgives oralt i en enkelt dosis til tamhøner, som om nødvendigt har været beskyttet mod akutte kolinerge effekter. Dyrene observeres i 21 dage for unormal adfærd, ataxi og paralyse. Der foretages biokemiske målinger, navnlig inhibition af neurotoksisk esterase, på tilfældigt udvalgte høner fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer efter indgift. 21 dage efter eksponering aflives de resterende høner, og der foretages en histopatologisk undersøgelse af udvalgt nervevæv.

1.5. Beskrivelse af testmetoden

1.5.1. *Forberedelser*

Unge, sunde kønsmodne høner, der er fri for virussygdomme og medicinering, der kan interferere med undersøgelsen, og hvis gang er normal, fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper og tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage inden undersøgelsens påbegyndelse.

Der anvendes bure eller indelukker, der giver hønsene fri bevægelighed, og som tillader uhindret observation af dyrenes gang.

Teststoffet bør normalt indgives oralt med mavesonde, gelatinekapsler eller en tilsvarende metode. Væsker kan indgives ufortyndet eller opløst i et passende vehikel, som f.eks. majsolie; faste stoffer bør om muligt opløses, eftersom store doser faste stoffer i gelatinekapsler ikke altid absorberes effektivt. For ikke-vandige vehikler skal vehiklets toksiske egenskaber kendes eller i givet fald bestemmes inden forsøget.

1.5.2. *Forsøgsbetingelser*

1.5.2.1. Forsøgsdyr

Unge, kønsmodne læggehøner (Gallus gallus domesticus) på otte til tolv måneder anbefales. Der anvendes racer og stammer af standardstørrelse, og hønsene bør normalt være opdrættet under betingelser, som tillader bevægelsesfrihed.

1.5.2.2. Antal og køn

Ud over forsøgsgruppen anvendes både en vehikelkontrolgruppe og en positiv kontrolgruppe. Vehikelkontrolgruppen behandles på samme måde som forsøgsgruppen, med undtagelse af administration af teststoffet.

Der anvendes et tilstrækkeligt antal høner i hver gruppe, så mindst seks høns kan aflives med henblik på biokemisk bestemmelse (tre på hvert af de to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 21 dage lange observationsperiode med henblik på patologisk undersøgelse.

Den positive kontrolgruppe kan undersøges samtidig eller kan være en nylig historisk kontrolgruppe. Gruppen indeholder mindst seks høner, der behandles med et kendt neurotoksisk stof med forsinket virkning, tre høner til biokemisk undersøgelse og tre høner til patologisk undersøgelse. Regelmæssig ajourføring af historiske data anbefales. Der tilvejebringes nye data om positiv kontrol, hvis det pågældende laboratorium har ændret væsentlige elementer (f.eks. stamme, foder, laboratoriemiljø) i forsøgets gennemførelse.

1.5.2.3. Dosisniveauer

Der gennemføres en forundersøgelse med et passende antal høner og dosisniveaugrupper med henblik på at fastsætte det dosisniveau, der skal anvendes i hovedundersøgelsen. En vis dødelighed er normalt nødvendig i denne forundersøgelse til fastsættelse af en passende dosis til hovedundersøgelsen. For at forhindre dødsfald som følge af akutte kolinerge effekter kan imidlertid atropin eller et andet beskyttende middel, der vides ikke at interferere med forsinkede neurotoksiske reaktioner, anvendes. En række forskellige testmetoder kan anvendes til at vurdere den højeste ikkedødelige dosis af teststofferne (se metode B.1.bis). Historiske data fra undersøgelser af høner eller andre toksikologiske oplysninger kan også anvendes som støtte ved valg af dosis.

Dosisniveauet for teststoffet i hovedundersøgelsen bør være så højt som muligt under hensyntagen til resultaterne af forundersøgelsen og den øvre dosisgrænse på 2 000 mg/kg legemsvægt. Eventuel dødelighed må ikke forhindre, at et tilstrækkeligt antal dyr overlever med henblik på biokemisk undersøgelse (seks) og histologisk undersøgelse (seks) efter 21 dage. Atropin eller et andet beskyttende middel, der vides ikke at interferere med forsinkede neurotoksiske raktioner, anvendes for at forhindre dødsfald som følge af akutte kolinerge effekter.

1.5.2.4. Grænsetest

Hvis et forsøg udført efter de her beskrevne retningslinjer med et dosisniveau på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt/dag ikke fremkalder observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke kan ventes toksisk virkning på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer, kan en undersøgelse med anvendelse af en højere dosis betragtes som unødvendig. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

1.5.2.5. Observationsperiode

Observationsperioden varer 21 dage.

1.5.3. *Fremgangsmåde*

Efter indgift af et beskyttende middel til forhindring af dødsfald som følge af akut kolinerg effekt indgives teststoffet i en enkelt dosis.

1.5.3.1. Generelle observationer

Observationsperioden starter umiddelbart efter eksponering. Alle hønerne observeres omhyggeligt flere gange i løbet af de første to dage og derefter mindst en gang dagligt i en periode på 21 dage eller indtil det fastlagte aflivningstidspunkt. Alle tegn på toksicitet registreres, herunder tidspunktet for indtræden af unormal adfærd og dennes type, grad og varighed. Ataxi måles efter en talskala med mindst fire niveauer, og paralyse registreres. Mindst to gange om ugen udtages de høner, der er udvalgt til patologisk undersøgelse, af burene og underkastes en periode med tvungen motorisk aktivitet, som f.eks. stigeklatring, med henblik på at lette observationen af minimale toksiske virkninger. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

1.5.3.2. Legemsvægt

Alle hønerne vejes lige inden indgift af teststoffet og mindst én gang om ugen derefter.

1.5.3.3. Biokemisk undersøgelse

Seks vilkårligt udvalgte høner fra hver forsøgs- og vehikelkontrolgruppe og tre høner fra den positive kontrolgruppe (hvis denne guppe undersøges samtidig) aflives inden for få dage efter indgift, og hjernen og den lumbale rygmarv præpareres og undersøges for inhibition af neurotoksisk esterase. Normalt aflives tre høner fra vehikelkontrolgruppen og fra hver forsøgsgruppe efter 24 timer og tre efter 48 timer, mens de tre høner fra den positive kontrolgruppe aflives efter 24 timer. Hvis observation af kliniske tegn på forgiftning (dette kan ofte vurderes ved observation af tidspunktet for indtræden af kolinerge symptomer) indicerer, at det toksiske stof udskilles meget langsomt, kan det være bedre at udtage væv fra tre høner på hvert af to andre tidspunkter mellem 24 timer og 72 timer efter administration.

Hvis det skønnes hensigtsmæssigt, kan der også foretages analyser af acetylcholinesterase (AChE) på disse prøver. Spontan reaktivering af AChE kan imidlertid indtræde in vivo og således føre til, at stoffets AChE-inhiberende aktivitet undervurderes.

1.5.3.4. Makroskopisk undersøgelse

Den makroskopiske undersøgelse af alle dyrene (aflivet efter forsøgets afslutning eller under forsøget, fordi de var døende) omfatter observation af udseende af hjerne og rygmarv.

1.5.3.5. Histopatologisk undersøgelse

Der foretages en mikroskopisk undersøgelse af nervevæv fra dyr, der overlever observationsperioden, og som ikke er anvendt til de biokemiske undersøgelser. Væv fikseres in situ ved anvendelse af perfusionsmetoder. Snittene bør omfatte cerebellum (længdesnit langs midterlinjen), medulla oblongata, rygmarv og de perifere nerver. Rygmarvssnit tages fra det øvre cervikale segment, midt i brysthulen og det lumbosakrale område. Der tages snit af det distale område af tibianerven og dens udløbere til musculus gastrocnemius og af ischiasnerven. Snittene farves med passende myelin- og axonspecifikke farver.

2. DATA

Hvis resultaterne for de udvalgte endepunkter i denne metode (biokemi, histopatologi og adfærdsobservation) er negative, kræves der normalt ikke yderligere undersøgelse for forsinket neurotoksicitet. Ved tvetydige eller inkonklusive resultater for disse endepunkter kan yderligere vurdering være nødvendig.

Der tilvejebringes individuelle data. Herudover opstilles alle data i tabelform, der for hver forsøgsgruppe viser antallet af dyr ved forsøgets start, antallet af dyr, der udviser læsioner, adfærdsmæssige eller biokemiske virkninger, typen og graden af disse læsioner eller virkninger og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type eller grad af læsion eller virkning.

Resultaterne af denne undersøgelse vurderes med hensyn til incidensen og sværhedsgraden af og korrelationen mellem adfærdsmæssige, biokemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerede virkninger i forsøgs- og kontrolgrupper.

Resultater i talform vurderes med passende og generelt accepterede statistiske metoder. De anvendte statistiske metoder udvælges i forbindelse med forsøgets udformning.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme:

— dyrenes antal og alder

— herkomst, laboratoriemiljø osv.

— hvert af dyrenes vægt ved forsøget begyndelse.

Forsøgsbetingelser:

— oplysninger om teststoffets formulering, stabilitet og homogenitet, hvor dette er relevant

— begrundelse for valg af vehikel

— oplysninger om indgift af teststoffet

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— begrundelse for valg af dosis

— angivelse af indgivne doser, herunder oplysninger om vehiklet og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— oplysninger om eventuelle beskyttelsesmidler og om indgift heraf.

Resultater:

— data for legemsvægt

— data for toksiske reaktioner pr. gruppe, herunder dødelighed

— de kliniske observationers art, grad og varighed (reversible eller ej)

— en detaljeret beskrivelse af biokemiske metoder og fund

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. LITTERATURHENVISNINGER

Denne metode svarer til TG 418 fra OECD.

B.38 FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER GENTAGEN DOSIS — 28 DAGE

1. METODE

1.1. Indledning

Ved vurdering af stoffers toksiske virkninger er det vigtigt at undersøge visse stofgruppers mulighed for at fremkalde specifikke former for neurotoksicitet, som i givet fald ikke kan påvises i andre toksicitetsundersøgelser. Visse organiske phosphorforbindelser har vist sig at forårsage forsinket neurotoksicitet og bør undersøges med henblik herpå.

Der kan anvendes in vitro-screeningtests til identificering af stoffer, som kan forårsage forsinket polyneuropati; negative resultater af in vitro-undersøgelser kan imidlertid ikke bruges som dokumentation for, at teststoffet ikke er neurotoksisk.

Denne 28 dages test for forsinket neurotoksicitet giver oplysninger om mulige sundhedsrisici som følge af gentagen eksponering i et begrænset tidsrum. Testen giver oplysninger om dosis/respons og kan danne grundlag for en vurdering af et nul-effekt-niveau (NOAEL), som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for eksponering.

Se den generelle indledning til afsnit. B.

1.2. Definitioner

Organiske phosphorforbindelser omfatter uladede estere, thioestere og anhydrider af organiske phosphorsyrer, phosphonsyrer og phosphoramidsyrer eller tilsvarende phosphorthiosyrer, phosphonthiosyrer og phosphorthioamidsyrer eller andre stoffer, der kan forsårsage den forsinkede neurotoksicitet, der til tider forekommer for denne stofgruppe.

Forsinket neurotoksicitet er et syndrom, der er knyttet til langvarig, forsinket opståen af ataxi, distal axonopati i rygmarv og perifere nerver og inhibition og aldring af neurotoksisk esterase (NTE) i nervevæv.

1.3. Testmetodens princip

Daglige doser af teststoffet indgives oralt til høner i 28 dage. Dyrene observeres mindst en gang dagligt for unormal adfærd, ataxi og paralyse indtil 14 dage efter sidste dosis. Der foretages biokemiske målinger, navnlig inhibition af neurotoksisk esterase (NTE), på tilfældigt udvalgte høner fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer efter sidste dosis. To uger efter sidste dosis aflives de resterende høner, og der foretages en histopatologisk undersøgelse af udvalgt nervevæv.

1.4. Beskrivelse af testmetoden

1.4.1. *Forberedelser*

Unge, sunde kønsmodne høner, der er fri for virussygdomme og medicinering, der kan interferere med undersøgelsen, og hvis gang er normal, fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper og tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage inden undersøgelsens påbegyndelse.

Der anvendes bure eller indelukker, der giver hønsene fri bevægelighed, og som tillader uhindret observation af dyrenes gang.

Teststoffet bør normalt indgives oralt med mavesonde, gelatinekapsler eller en tilsvarende metode. Væsker kan indgives ufortyndet eller opløst i et passende vehikel, som f.eks. majsolie; faste stoffer bør om muligt opløses, eftersom store doser faste stoffer i gelatinekapsler ikke altid absorberes effektivt. For ikke-vandige vehikler skal vehiklets toksiske egenskaber kendes eller i givet fald bestemmes inden forsøget.

1.4.2. *Forsøgsbetingelser*

1.4.2.1. Forsøgsdyr

Unge, kønsmodne høner (Gallus gallus domesticus) på otte til tolv måneder anbefales. Der anvendes racer og stammer af standardstørrelse, og hønerne bør normalt være opdrættet under betingelser, som tillader bevægelsesfrihed.

1.4.2.2. Antal og køn

Der anvendes generelt mindst tre forsøgsgrupper og en vehikelkontrolgruppe. Vehikelkontrolgruppen behandles på samme måde som forsøgsgruppen, med undtagelse af administration af teststoffet.

Der anvendes et tilstrækkeligt antal høner i hver gruppe, så mindst seks høner kan aflives med henblik på biokemisk bestemmelse (tre på hvert af de to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 14 dage lange observationsperiode efter eksponering med henblik på patologisk undersøgelse.

1.4.2.3. Dosisniveauer

Dosisniveauerne vælges under hensyntagen til resultaterne af en test for forsinket neurotoksicitet efter akut eksponering og eventuelle andre foreliggende data vedrørende teststoffets toksicitet eller kinetik. Det højeste dosisniveau vælges med henblik på at inducere toksiske virkninger, om muligt forsinket neurotoksicitet, men ikke død eller tydelig lidelse. Herefter vælges en række dosisniveauer i faldende størrelse til påvisning af dosisrelaterede reaktioner og fravær af erkendbare virkninger (NOAEL) ved det laveste dosisniveau.

1.4.2.4. Grænsetest

Hvis et forsøg udført efter de her beskrevne retningslinjer med et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag ikke fremkalder observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke kan ventes toksiske virkninger på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer, kan en undersøgelse med anvendelse af en højere dosis betragtes som unødvendig. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

1.4.2.5. Observationsperiode

Dyrene observeres mindst en gang dagligt i eksponeringsperioden og 14 dage efter, medmindre de skal obduceres.

1.4.3. *Fremgangsmåde*

Dyrene indgives teststoffet syv dage om ugen i en periode på 28 dage.

1.4.3.1. Generelle observationer

Observationsperioden starter umiddelbart efter eksponering. Alle hønerne observeres omhyggeligt mindst en gang daglig i de 28 dage og i 14 dage efter eksponering, eller indtil det fastlagte aflivningstidspunkt. Alle tegn på toksicitet registreres, herunder tidspunktet for indtræden af unormal adfærd og dennes type, grad og varighed. Observationerne omfatter, men er ikke begrænset til, unormal adfærd. Ataxi måles efter en talskala med mindst fire niveauer, og paralyse registreres. Mindst to gange om ugen udtages hønerne af burene og underkastes en periode med tvungen motorisk aktivitet, som f.eks. stigeklatring, med henblik på at lette observationen af minimale toksiske virkninger. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

1.4.3.2. Legemsvægt

Alle hønsene vejes lige inden indgift af teststoffet og mindst én gang om ugen derefter.

1.4.3.3. Biokemisk undersøgelse

Seks vilkårligt udvalgte høner fra hver forsøgs- og vehikelkontrolgruppe aflives få dage efter indgift af sidste dosis, og hjernen og den lumbale rygmarv præpareres og undersøges for inhibition af neurotoksisk esterase. Derudover kan det være nyttigt at præparere og undersøge ischiasnervevæv for inhibition af neurotoksisk esterase. Normalt aflives tre høner fra kontrolgruppen og fra hver forsøgsgruppe 24 timer og tre 48 timer efter sidste dosis. Hvis data fra undersøgelsen for akut toksicitet eller andre undersøgelser (f.eks. toksikokinetik) indicerer, at andre tidspunkter for aflivning efter sidste dosis er bedre end de her nævnte, anvendes disse med angivelse af begrundelsen herfor.

Hvis det skønnes hensigtsmæssigt, kan der også foretages analyser af acetylcholinesterase (AChE) på disse prøver. Spontan reaktivering af AChE kan imidlertid indtræde in vivo og således føre til, at stoffets AChE-inhiberende aktivitet undervurderes.

1.4.3.4. Makroskopisk undersøgelse

Den makroskopiske undersøgelse af alle dyrene (aflivet efter forsøgets afslutning eller under forsøget, fordi de var døende) omfatter observation af hjerne og rygmarv.

1.4.3.5. Histopatologisk undersøgelse

Der foretages en mikroskopisk undersøgelse af nervevæv fra dyr, der overlever observationsperioden, og som ikke er anvendt til de biokemiske undersøgelser. Væv fikseres in situ ved anvendelse af perfusionsmetoder. Snittene bør omfatte cerebellum (længdesnit langs midterlinjen) medulla oblongata, rygmarv og de perifere nerver. Rygmarvssnit tages fra det øvre cervikale segment, midt i brysthulen og det lumbosakrale område. Der tages snit af det distale område af tibianerven og dens udløbere til musculus gastrocnemius og ischiasnerven. Snittene farves med passende myelin- og axonspecifikke farver. Først foretages der en mikroskopisk undersøgelse af præserveret væv fra alle dyrene i kontrolgruppen og højdosisgruppen. Hvis der er tegn på virkninger i højdosisgruppen, foretages der også en mikroskopisk undersøgelse af høner fra mellem- og lavdosisgrupperne.

2. DATA

Hvis resultaterne for de udvalgte endepunkter i denne metode (biokemi, histopatologi og adfærdsobservation) er negative, kræves der normalt ikke yderligere undersøgelse for forsinket neurotoksicitet. Ved tvetydige eller inkonklusive resultater for disse endepunkter kan yderligere vurdering være nødvendig.

Der tilvejebringes individuelle data. Herudover opstilles alle data i tabelform, der for hver forsøgsgruppe viser antallet af dyr ved forsøgets start, antallet af dyr, der udviser læsioner, adfærdsmæssige eller biokemiske virkninger, typen og graden af disse læsioner eller virkninger og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type eller grad af læsion eller virkning.

Resultaterne af denne undersøgelse vurderes med hensyn til incidensen og sværhedsgraden og af korrelationen mellem adfærdsmæssige, biokemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerede virkninger i forsøgs- og kontrolgrupper.

Resultater i talform vurderes med passende og generelt accepterede statistiske metoder. De anvendte statistiske metoder udvælges i forbindelse med forsøgets udformning.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapport

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme:

— dyrenes antal og alder

— herkomst, laboratoriemiljø osv.

— hvert af dyrenes vægt ved forsøgets begyndelse.

Forsøgsbetingelser:

— oplysninger om teststoffets formulering, stabilitet og homogenitet, hvor dette er relevant

— begrundelse for valg af vehikel

— oplysninger om indgift af teststoffet

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— begrundelse for valg af dosis

— angivelse af indgivne doser, herunder oplysninger om vehiklet og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— begrundelse for valg af andre tidspunkter for biokemisk bestemmelse end efter 24 og 48 timer.

Resultater:

— data for legemsvægt

— data for toksiske reaktioner pr. dosisniveau, herunder dødelighed

— nul-effekt-niveau (NOAEL)

— de kliniske observationers art, grad og varighed (reversible eller ej)

— en detaljeret beskrivelse af biokemiske metoder og fund

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **LITTERATURHENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 419 fra OECD.

»B.39. TEST FOR UNSCHEDULED DNA-SYNTESE (UDS) MED PATTEDYRLEVERCELLER IN VIVO

1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 486 »Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo« (1997).

1.1. INDLEDNING

Formålet med testen for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo er at påvise, om et teststof inducerer DNA-reparation i levercellerne hos de behandlede dyr (1) (2) (3) (4).

Denne in vivo-test indeholder en metode til undersøgelse af kemikaliers gentoksiske virkninger i leveren. Det målte endpoint er tegn på DNA-beskadigelse og deraf følgende reparation i leverceller. Leveren er normalt det sted, hvor absorberede stoffer først og fremmest metaboliseres. Den er derfor et egnet sted til in vivo-måling af DNA-beskadigelse.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet ikke vil nå frem til målvævet, er denne tekst ikke egnet.

Endpoint for unscheduled DNA-syntese (UDS) måles ved at bestemme optagelsen af mærkede nukleosider i celler, hvor der ikke foregår planmæssig DNA-syntese (S-fase). Den mest benyttede teknik består i at bestemme optagelsen af tritiummærket thymidin (^{3}H-TdR) ved autoradiografi. Der bør fortrinsvis benyttes rottelevere i UDS-test in vivo. Der kan benyttes andet væv end levervæv, men det er ikke omfattet af denne metode.

Påvisningen af et UDS-respons afhænger af, hvor mange DNA-baser der er skåret ud og erstattet på det beskadigede sted. Derfor er UDS-testen særlig værdifuld til påvisning af stoffremkaldt »longpatch repair« (20-30 baser). Til gengæld er følsomheden over for »shortpatch repair« (1-3 baser) meget lavere. Endvidere kan der optræde mutagene hændelser som følge af manglende reparation, forkert reparation eller forkert replikation af DNA-skader. UDS-metodens reaktion er ikke noget mål for, i hvor høj grad reparationsprocessen er lykkedes. Ydermere er det muligt, at et mutagen reagerer med DNA, men at DNA-beskadigelsen ikke repareres ved en udskæringsreparationsproces. De beskedne specifikke oplysninger om mutagen aktivitet, som UDS-testen giver, opvejes af, at dens endpoint potentielt har høj følsomhed, eftersom det måles i hele genomet.

Se også den generelle indledning til afsnit B.

1.2. DEFINITIONER

Celler under reparation: Et NNG-tal, der er højere end en forud fastsat værdi, som det laboratorium, der udfører testen, skal begrunde.

Nettokernekorn (NNG): Kvantitativt mål for cellers UDS-aktivitet ved en autoradiografisk UDS-test; tallet beregnes ved at trække gennemsnitsantallet af cytoplasmakorn i kerneækvivalente områder af cytoplasmaet (CG) fra antallet af kernekorn (NG), dvs. NNG = NG − CG. NNG-tallet beregnes for den enkelte celle, hvorefter tallene samles i puljer for celler i samme kultur, for parallelle kulturer osv.

Unscheduled DNA-syntese (UDS): DNA-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en DNA-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

UDS-testen med pattedyrleverceller in vivo viser DNA-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en DNA-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger. Testen baseres sædvanligvis på indsætning af ^{3}H-TdR i DNA'et i leverceller, hvor der er lav forekomst af celler i cellecyklussens S-fase. Optagelse af ^{3}H-TdR bestemmes normalt ved autoradiografi, eftersom denne teknik, i modsætning til f.eks. væskescintillation, ikke er følsom over for interferens fra celler i S-fase.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis rotter, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20% af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til afsnit B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60%.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene.

1.4.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I hver individuelt gennemført del af forsøget medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolstoffer bør være stoffer, der vides at fremkalde UDS, når de indgives i en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Positive kontrolstoffer, der kræver metabolismeaktivering, bør benyttes i doser, der frembringer moderat reaktion (4). Doserne kan vælges på en sådan måde, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas's identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

Prøveudtagningstidspunkt	Stof	CAS nr.	Einecs nr.
Tidlig prøveudtagning (2-4 timer)	*N*-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Sen prøveudtagning	N-2-fluorenylacetamid	53-96-3	200-188-6

Der kan anvendes andre egnede positive kontrolstoffer. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Der anvendes tilstrækkelig mange dyr til, at der er taget hensyn til den naturlige variation i reaktionerne på testen. Der skal være mindst tre analyserbare dyr i hver gruppe. Er der indsamlet en betydelig historisk database, kræves der kun et eller to dyr i sideløbende negative og positive kontrolgrupper.

Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn, helst hanner, tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives normalt i en enkelt behandling.

1.5.3. **Dosisniveauer**

Normalt benyttes der to dosisniveauer. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Normalt bør laveste dosis være mellem 50 % og 25 % af den højeste dosis.

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen.

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i leveren (f.eks. pyknotiske kerner).

1.5.4. **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg pr. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, er en fuldstændig undersøgelse muligvis ikke nødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Intraperitoneal injektion anbefales ikke, da leveren derved kan udsættes for teststoffet direkte og ikke via kredsløbet. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. **Præparering af leverceller**

Leverceller fra behandlede dyr præpareres normalt 12-16 timer efter indgiften. Medmindre reaktionen på dette tidspunkt er tydeligt positiv, er desuden yderligere en tidlig prøveudtagning (normalt to-fire timer efter indgiften) sædvanligvis påkrævet. Andre tidspunkter for prøveudtagning kan benyttes, når de kan begrundes med toksikokinetiske data.

Korttidskulturer af pattedyrleverceller etableres sædvanligvis ved perfusion af leveren in situ med collagenase, idet man lader frisk dissocierede leverceller sætte sig fast på en egnet flade. Leverceller fra negative kontroldyr skal have en levedygtighed (5) på mindst 50 %.

1.5.7. **Bestemmelse af UDS**

Nyligt isolerede pattedyrleverceller inkuberes normalt i et medium, der indeholder ^{3}H-TdR i et passende tidsrum, f.eks. tre-otte timer. Når inkubationstiden er afsluttet, fjernes mediet fra cellerne, som dernæst kan inkuberes i et medium, der indeholder overskud af umærket thymidin, så ikke-indbygget radioaktivitet (»cold chase«) bliver mindst mulig. Cellerne skylles, fikseres og tørres. Ved længere inkuberingstider er »cold chase« ikke altid nødvendigt. Objektglassene dyppes i autoradiografiemulsion, eksponeres i mørke (f.eks. i køleskab i 7-14 dage), fremkaldes og farves, og de eksponerede sølvkorn tælles. Der fremstilles to-tre objektglas pr. dyr.

1.5.8. **Analyse**

De præparede objektglas skal indeholde tilstrækkelig mange celler med normal morfologi til, at der kan foretages en meningsfyldt vurdering af UDS. Præparaterne undersøges mikroskopisk for tegn på åbenlys cytotoksicitet (f.eks. pyknose eller nedsat radioaktiv mærkning).

Objektglassene kodes, inden kornene tælles. Normalt bedømmes der 100 celler fra hvert dyr på mindst to objektglas; bedømmelse af mindre end 100 celler pr. dyr skal begrundes. Der tælles ikke korn for celler i S-fase, men andelen af celler i S-fase kan registreres.

Den mængde ^{3}H-TdR, der indbygges i kerner og cytoplasma i morfologisk normale celler, og som giver sig udtryk i afsættelse af sølvkorn, bestemmes med egnede metoder.

Der foretages korntælling over kernerne (kernekorn, NG) og kerneækvivalente områder over cytoplasmaet (cytoplasmakorn, CG). CG-tallene fremkommer enten ved at tage de kraftigst mærkede cytoplasmaområder eller ved at tage gennemsnittet af to-tre tilfældigt foretagne tællinger af cytoplasmakorn i nærheden af kernerne. Der kan benyttes andre tællemetoder (f.eks. helcelletælling), hvis de kan begrundes (6).

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene præsenteres for hvert enkelt objektglas og hvert enkelt dyr. Desuden sammenfattes alle data i tabelform. For hver celle, hvert dyr og hver dosis og tidspunkt beregnes tallet for nettokernekorn (NNG) ved at trække CG-tallene fra NG-tallene. Hvis der tælles »celler under reparation«, skal de kriterier, der benyttes til definering af »celler under reparation«, begrundes og underbygges med tidligere og sideløbende negative kontroldata. Talresultater kan evalueres ved statistiske metoder. Eventuelt benyttede statistiske test skal vælges og begrundes, inden undersøgelsen gennemføres.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Nedenfor følger nogle eksempler på kriterier for positiv/negativ reaktion:

positiv	(i)	NNG-værdier, der er højere end en forud fastsat tærskelsværdi, som er begrundet med udgangspunkt i laboratoriets tidligere data
eller	(ii)	NNG-værdier, der er signifikant større end sideløbende kontrol.
negativ	(i)	NNG-værdier, der er inden for eller under en kontroltærskelværdi, der bygger på tidligere resultater
eller	(ii)	NNG-værdier, der ikke er signifikant større end sideløbende kontrol

Dataenes biologiske relevans skal tages i betragtning, f.eks. sådanne parametre som variation mellem dyr, sammenhæng mellem dosis og respons og cytotoksicitet. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en test for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo viser, at teststoffet inducerer DNA-skader i pattedyrleverceller in vivo, som kan repareres ved unscheduled DNA-syntese in vivo. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke inducerer DNA-skader, der kan påvises ved denne test.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. RAPPORTERING

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr og deres alder og køn

— oprindelse, miljø, føde, mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for indgiftsvej

— eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— metoder til præparering og dyrkning af leverceller

— anvendt autoradiografiteknik

— antal præparerede objektglas og antal bedømte celler

— evalueringskriterier

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— gennemsnitsværdier af kernekorn, cytoplasmakorn og nettokernekorn for hvert enkelt objektglas, dyr og gruppe

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— tegn på toksicitet

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— antal »celler under reparation«, hvis det er bestemt

— antal celler i S-fase, hvis det er bestemt

— cellernes levedygtighed

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. REFERENCER

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, *156*, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, *189*, pp. 12-133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, *Mutations Res.*, *312*, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Inititial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, *291*, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, *4*, pp. 553-562.«

1. METODE

1.1. Indledning

To in vitro-test til måling af hudætsning er blevet anerkendt som videnskabeligt validerede af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM, Det Fælles Forskningscenter, Europa-Kommissionen) (1) (2) (3): måling af transkutan elektrisk modstand (TER) i rottehud og en test, hvor der anvendes en human hudmodel. ECVAM-valideringsundersøgelsen viste, at begge testmetoder var pålidelige med hensyn til at kunne skelne mellem stoffer, der er kendt for at være hudætsende, og stoffer, der er kendt for ikke at være det. Derudover kunne man med forsøgsprotokollen baseret på en human hudmodel skelne korrekt mellem grader af hudætsning (stoffer, der er kendt for at være alvorligt hudætsende, R35, og andre hudætsende stoffer, R34) (2). Beskrivelse og fremgangsmåde for begge metoder er anført nedenfor; valg af test afhænger af brugerens specifikke behov og præferencer.

Se desuden den generelle indledning, del B.

1.2. Definitioner

Hudætsning: fremkomsten af irreversibel vævsødelæggelse i huden efter applikation af teststof.

1.3. Referencestoffer

Ingen nærmere angivet, men se punkt 1.5.3.4 og 1.7.2.3.

1.4. Princippet i testmetoden — Rottehud-TER-testen

Testmaterialet appliceres i op til 24 timer på den epidermale overflade (ydersiden af huden) af hudlapper fra unge rotter, der er humant aflivede. At et stof er ætsende, viser sig ved, at det kan beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion, hvilket kan måles som en reduktion i den naturlige TER under en tærskelværdi (5 kΩ) (4) (5). Irriterende og ikke-irriterende stoffer medfører ikke TER under tærskelværdien. Et farvebindingstrin kan føjes til testen ved undersøgelser af overfladeaktive stoffer og neutrale organiske stoffer (se definitioner i reference 6); herved mindskes antallet af falsk positive resultater, som særligt forekommer ved disse stoffer (2) (7).

1.5. Beskrivelse af testmetode — Rottehud-TER-testen

1.5.1. *Forsøgsdyr*

Til fremstilling af hudlapper anvendes unge rotter (20-23 dage gamle, Wistar eller lignende stamme). Hårene på ryggen og flanken fjernes omhyggeligt med en lille dyresaks. Dyrene vaskes dernæst omhyggeligt, idet det pågældende hudområde holdes neddyppet i en opløsning af antibiotika (f.eks. streptomycin, penicillin, chloramphenicol og amphotericin i koncentrationer høje nok til at hæmme bakterievækst). Forsøgsdyrene vaskes igen med antibiotika på tredje- og fjerdedagen efter den første vask og skal derefter anvendes inden tre dage. (Dyrene må ikke være ældre end 31 dage med henblik på fremstilling af hudlapper).

1.5.2. *Fremstilling af hudlapper*

Forsøgsdyrene aflives humant. Ryghuden fjernes fra dyrene og overflødigt fedtvæv fjernes omhyggeligt. Huden anbringes for enden af et rør af PTFE (polytetrafluorethylen), idet man sikrer sig, at den epidermale overflade er i kontakt med røret. En gummi »O«-ring sættes tætsluttende omkring rørets ende for at holde huden på plads, og overflødigt væv klippes af. Rørets og »O«-ringens dimensioner ses på figur 1. Der tætnes med vaseline, så »O«-ringen slutter helt til enden af PTFE-røret. Røret fastholdes ved hjælp af fjederklemmer i et ydre kammer, som indeholder en magnesiumsulphatopløsning (154 mM) (figur 2).

1.5.3. *Fremgangsmåde*

1.5.3.1. Applikation af testmaterialet

Flydende teststoffer (150 µl) appliceres på den epidermale overflade inde i røret (figur 2). Drejer det sig om faste stoffer, skal tilstrækkeligt af stoffet påføres hudlappen, så hele overfladen er dækket af stoffet. Deioniseret vand (150 µl) tilsættes oven på stoffet, og røret rystes forsigtigt. Teststoffet skal have maksimal kontakt med huden. Med henblik herpå kan det være nødvendigt at opvarme visse faste stoffer til 30 °C, så de smelter, eller rive dem til et kornet materiale eller male dem til pulver.

Der bruges tre hudlapper til hvert teststof. Stofferne skal være i kontakt med hudlappen i 24 timer (se ligeledes 1.5.3.4). Stoffet fjernes ved spuling under vandhane med vand med en temperatur på højst 30 °C, indtil der ikke kan fjernes mere af stoffet. Stoffer, der er stivnet i røret, kan eventuelt fjernes ved hjælp af en kraftig stråle vand, der er omkring 30 °C varmt.

1.5.3.2. TER-målinger

TER måles ved hjælp af en lavvoltvekselstrømsdatabro (f.eks. AIM 401 eller 6401 eller tilsvarende). Før den elektriske modstand måles, reduceres hudens overfladespænding ved tilsætning af 70% ethanol i tilstrækkelig mængde, så hele hudens overflade dækkes. Efter nogle få sekunder fjernes ethanolet, ved at man vender røret på hovedet, og vævet hydreres nu ved tilsætning af 3 ml magnesiumsulphatopløsning (154 mM). Elektroderne fra databroen anbringes nu på hver sin side af hudlappen for at måle modstanden i kΩ/hudlap (figur 2). Elektrodedimensioner og længden af elektroderne under krokodillenæbbene ses i figur 1. Klemmen (krokodillenæbbet) på den indre (tykke) elektrode hviler på toppen af PTFE-røret under selve modstandsmålingen, hvorved man sikrer sig, at et konstant stykke af elektroden er neddykket i opløsningen af magnesiumsulphat. Den ydre (tynde) elektrode er anbragt inde i det ydre kammer, så det rører ved kammerbunden. Afstanden mellem den nederste del af den fjedrende klemme og bunden af PTFE-røret skal holdes konstant, da den har indflydelse på den målte modstand.

Bemærk, at målinger på over 20 kΩ kan skyldes, at teststoffet ligger som en belægning på hudens overflade. Man kan forsøge at fjerne stoffet ved at ryste PTFE-røret i 10 sekunder, mens man dækker åbningen med en tommelfinger iført en gummitut; magnesiumsulphatopløsningen kasseres, og målingen gentages med en ny magnesiumsulphatopløsning.

Gennemsnittet af TER-resultaterne accepteres, dersom værdierne af samtidigt udførte positive og negative kontroller falder inden for de for metoden accepterede grænser. For metode og apparatur, som beskrevet her, er de foreslåede kontrolstoffer og de dertil hørende accepterede grænser:

Kontrol	Stof	Modstandsgrænser (kΩ)
Positiv	10 M saltsyre (36%)	0,5-1,0
Negativ	Destilleret vand	10-25

1.5.3.3. Procedure tilpasset overfladeaktive og neutrale organiske stoffer

Hvis TER-værdierne for overfladeaktive eller neutrale organiske stoffer er mindre end eller lig med 5 kΩ, kan man undersøge et farvestofs evne til at trænge ned i vævet. Herved kan man afgøre, om resultaterne er falsk positive (2).

1.5.3.3.1. Applikation og fjernelse af farvestoffet sulforhodamin B

Efter at den epidermale overflade er blevet behandlet med teststoffet, appliceres 150 µl af en 10% (w/v)-opløsning af sulforhodamin B i destilleret vand på den epidermale overflade af hver hudlap i 2 timer. Hudlapperne spules under en vandhane i ca. 10 sekunder med vand, der ikke er varmere end stuetemperatur, for at fjerne overskydende/ikke-bundet farvestof. Hver hudlap fjernes omhyggeligt fra PTFE-røret og anbringes i et glas (f.eks. et 20 ml-glas til scintillationsmålinger) indeholdende deioniseret vand (8 ml). Glassene rystes forsigtigt i 5 minutter for at fjerne yderligere overskydende/ikke-bundet farvestof. Denne renseprocedure gentages, hvorefter hudlapperne fjernes og anbringes i glas, der indeholder 5 ml af en 30% (w/v)-opløsning af natriumdodecylsulphat (SDS) i destilleret vand. Glassene inkuberes ved 60 °C til næste dag. Efter inkubationen fjernes og kasseres hudlapperne, og den tilbageværende opløsning centrifugeres i 8 minutter ved 21 °C (relativ centrifugalkraft ~ 175). 1 ml af supernatanten fortyndes 1 til 5 (v/v) (1 ml + 4 ml) med en 30% (w/v) SDS-opløsning i destilleret vand. Opløsningens ekstinktion/optical density (OD) måles ved ca. 565 nm.

1.5.3.3.2. Beregning af farveindhold

Mængden af sulforhodamin B pr. hudlap beregnes ud fra OD-værdierne (sulforhodamin B's molære ekstinktionskoefficient ved 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekylvægten = 580). Mængden af sulforhodamin B beregnes for alle hudlapperne, og en gennemsnitlig mængde beregnes ud fra tredobbeltbestemmelserne. Den gennemsnitlige værdi for farvemængde accepteres under forudsætning af, at samtidigt opnåede kontrolværdier falder inden for de for metoden acceptable grænser. Følgende acceptable grænser for farvemængde i kontrollerne er foreslået for metode og apparat som beskrevet her:

Kontrol	Stof	Farvemængdegrænser (µg/lap)
Positiv	10 M saltsyre (36 %)	40-100
Negativ	Destilleret vand	15-35

1.5.3.4. Yderligere informationer

Teststoffer kan også appliceres på hudlapper i kortere tid (f.eks. 2 timer) med henblik på identifikation af stærkt ætsende stoffer. Man fandt imidlertid ved valideringsundersøgelserne af TER-testen, at den overvurderede adskillige stoffers ætsende evne, når de var applicerede på hudlapper i 2 timer (2), skønt den efter 24 timers applikation korrekt kunne identificere de ætsende og de ikke-ætsende stoffer.

Testapparaturets og forsøgsprocedurens egenskaber og dimensioner kan have indflydelse på de opnåede TER-værdier. Tærskelværdien for ætsning, 5 kΩ, blev bestemt med det apparatur og den fremgangsmåde, der er beskrevet i denne metode. Hvis testbetingelserne ændres betydeligt, kan der blive tale om andre tærskel- og kontrolværdier. Det anbefales derfor, at metoden og tærskelværdien for modstand kalibreres ved at teste en række referencestandarder, der vælges blandt de kemikalier, der blev anvendt i valideringsundersøgelsen (3).

1.6. Testmetodens princip — Måling ved forsøgsopstilling med human hud

Teststoffet appliceres i op til 4 timer på en tredimensional human hudmodel, omfattende en rekonstrueret epidermis med et fungerende stratum corneum. Ætsende stoffer identificeres ved deres evne til at nedsætte cellers levedygtighed (f.eks. påvist med MTT-reduktionstesten) under en fastlagt tærskelværdi efter en bestemt eksponeringstid. Testmetodens princip er i overensstemmelse med den hypotese, der siger, at kemikalier er ætsende, når de er i stand til at trænge gennem stratum corneum (ved diffusion eller erosion), og er tilstrækkeligt cytotoksiske til at fremkalde celledød i de underliggende cellelag.

1.7. Beskrivelse af testmetoden — Forsøgsopstilling med human hud

1.7.1. *Modeller for human hud*

Modeller for human hud kan hidrøre fra forskellige kilder, men de må opfylde visse kriterier. Modellen må have et fungerende stratum corneum med et underliggende lag af levende celler. Stratum corneums barrierefunktion må være tilstrækkelig. Dette kan vises ved, at hudmodellen ikke påvirkes af stoffer, der er cytotoksiske, men som ikke almindeligvis passerer stratum corneum. Modellens resultater skal være reproducerbare på veldefinerede betingelser.

De levende celler i modellen skal være tilstrækkelig levedygtige til, at de kan skelne klart mellem positive og negative kontroller. Efter at være udsat for en negativ kontrol skal cellernes levedygtighed (f.eks. som den kan måles med mængden af MTT-reduktion, dvs. en OD-værdi) være inden for acceptable grænser for den pågældende model. Vigtigst er det, at den anvendte model, der skal udsige noget om stoffers virkning, må have vist at kunne leve op til internationale valideringsstandarder (se reference 2).

1.7.2. *Fremgangsmåde*

1.7.2.1. Applikation af teststoffet

For flydende stoffer skal der appliceres tilstrækkeligt teststof til, at hudoverfladen dækkes (mindst 25 µl/cm^2). Det samme gælder for faste stoffer, og de skal fugtes, for at sikre god hudkontakt; om nødvendigt skal de males til et pulver, før de appliceres. Applikationsmåden skal kunne anvendes til en lang række kemiske stoffer (for eksempler se reference 2). Teststoffet skal omhyggeligt vaskes af hudoverfladen med fysiologisk saltvand, når eksponeringstiden er gået.

1.7.2.2. Måling af cellers levedygtighed

Enhver kvantitativ, godkendt metode kan bruges til måling af cellers levedygtighed. Den hyppigst anvendte måling er MTT-reduktionstesten, som har vist sig at give nøjagtige og reproducerbare resultater i forskellige laboratorier (2). Hudlappen anbringes i en MTT-opløsning på 0,3 mg/ml ved 20-28 °C i 3 timer. Den bundfældede blå formazan ekstraheres (ekstraktion med opløsningsmidler), og formazankoncentrationen beregnes ud fra måling af OD ved en bølgelængde mellem 545 og 595 nm.

1.7.2.3. Yderligere information

Den anvendte hudmodel og nøje overholdelse af applikationstid og vaskeprocedurer etc. har den største betydning for den målte cellelevedygtighed. Det anbefales, at metoden og modellen, der skal udsige noget om stoffers virkning, kalibreres med en serie standardreferencer, valgt blandt de kemikalier, der er brugt i ECVAM's valideringsundersøgelse (3). Kritisk er intra- og interlaboratoriel reproducerbarhed hvad angår en lang række kemikalier, i overensstemmelse med internationale standarder. Som et minimumskrav skal metoden leve op til kriterierne for videnskabelig gyldighed, som tidligere defineret (2), og resultaterne af en sådan valideringsundersøgelse skal være publicerede i et videnskabeligt tidsskrift med peer-review.

2. DATA

2.1. Behandling af resultaterne

2.1.1. *Rottehud-TER-testen*

De målte resultater for modstand (kΩ) i teststoffet, i positive og negative kontroller og alle standardreferencekemikalierne skal meddeles i tabelform, heri også data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser, gennemsnitsværdier og den deraf følgende klassifikation.

2.1.2. *Test med human hudmodel*

OD-værdier og beregnede tal for procentuel cellelevedygtighed for teststof, for positive og negative kontroller og for alle standardreferencekemikalier skal meddeles i tabelform, heri også data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser, gennemsnitsværdier og den deraf følgende klassifikation.

2.2. Evaluering og fortolkning af resultater

2.2.1. *Rottehud-TER-testen*

Hvis den gennemsnitlige TER-værdi for teststoffet er større end 5 kΩ, er stoffet ikke ætsende. Hvis TER-værdien er mindre end eller lig med 5 kΩ, og stoffet ikke er et overfladeaktivt stof eller et neutralt organisk stof, er det ætsende.

Hvis TER-værdierne for overfladeaktive eller neutrale organiske stoffer er mindre end eller lig med 5 kΩ, kan man undersøge et farvestofs evne til at trænge ned i vævet. Hvis det gennemsnitlige farveindhold i hudlappen er større end eller lig med det gennemsnitlige farveindhold i den sideløbende positive kontrol udført med 36 % HCl, er teststoffet en sand positiv og derfor ætsende. Hvis det gennemsnitlige farveindhold i hudlappen er mindre end det gennemsnitlige farveindhold i den sideløbende positive kontrol udført med 36 % HCl, er teststoffet en falsk positiv og derfor ikke ætsende.

2.2.2. *Test med human hudmodel*

OD fra den negative kontrol repræsenterer 100 % cellelevedygtighed; derfor kan de OD-værdier, som måles ved hver undersøgelse, anvendes til beregning af den procentuelle levedygtighed i forhold til den negative kontrol. Den procentuelle cut-off værdi af cellelevedygtighed, som adskiller ætsende fra ikke-ætsende stoffer (eller som skelner mellem forskellige grader af ætseevne), skal klart defineres i forbindelse den anvendte model, der skal udsige noget om stoffers virkning, før metoden godkendes, og den påfølgende valideringsundersøgelse må vise, at cut-off-værdien er hensigtsmæssig (for eksempel se reference 2).

3. FREMLÆGGELSE AF RESULTATER

Testrapport

Testrapporten skal som et minimum indeholde følgende oplysninger:

Teststof

— Identifikation, data, dets fysiske natur og, hvis relevant, fysisk-kemiske egenskaber. Tilsvarende information skal foreligge for eventuelle referencestoffer

Omstændigheder ved testen

— Detaljer i den anvendte fremgangsmåde

— Beskrivelse af og motivering for eventuelle modifikationer.

Resultater

— Angivelse i tabelform af målte værdier for modstand (TER-testen) eller værdier for den procentuelle levedygtighed (test med human hudmodel) for teststoffet, positive og negative kontroller og eventuelle standardreferencestoffer, og for data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser og gennemsnitsværdier

— Beskrivelse af eventuelle andre observationer.

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **REFERENCER**

(1) ECVAM (1998). ECVAM News & Views, *ATLA* 26, s. 275-280.

(2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, s. 483-524.

(3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, s. 471-482.

(4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, s. 507-512.

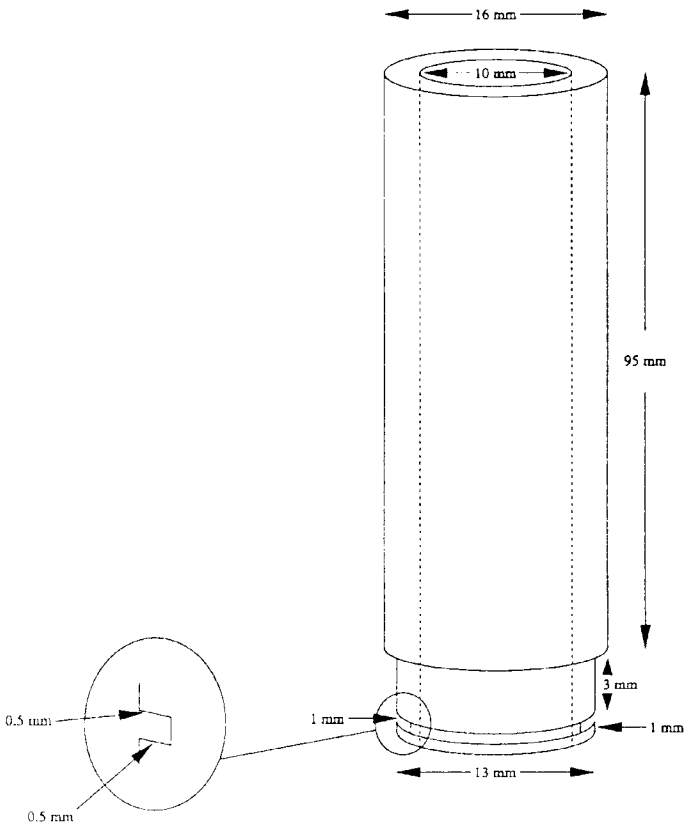
(5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, s. 191-194.

(6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, s. 709-720.

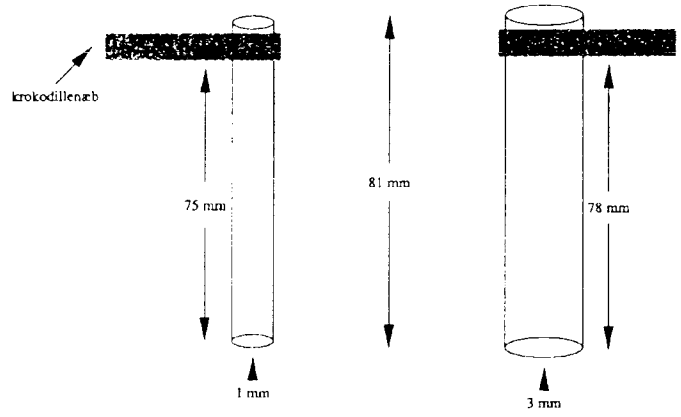
(7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, s. 219-255.

Figur 1

PTFE-rørs mål

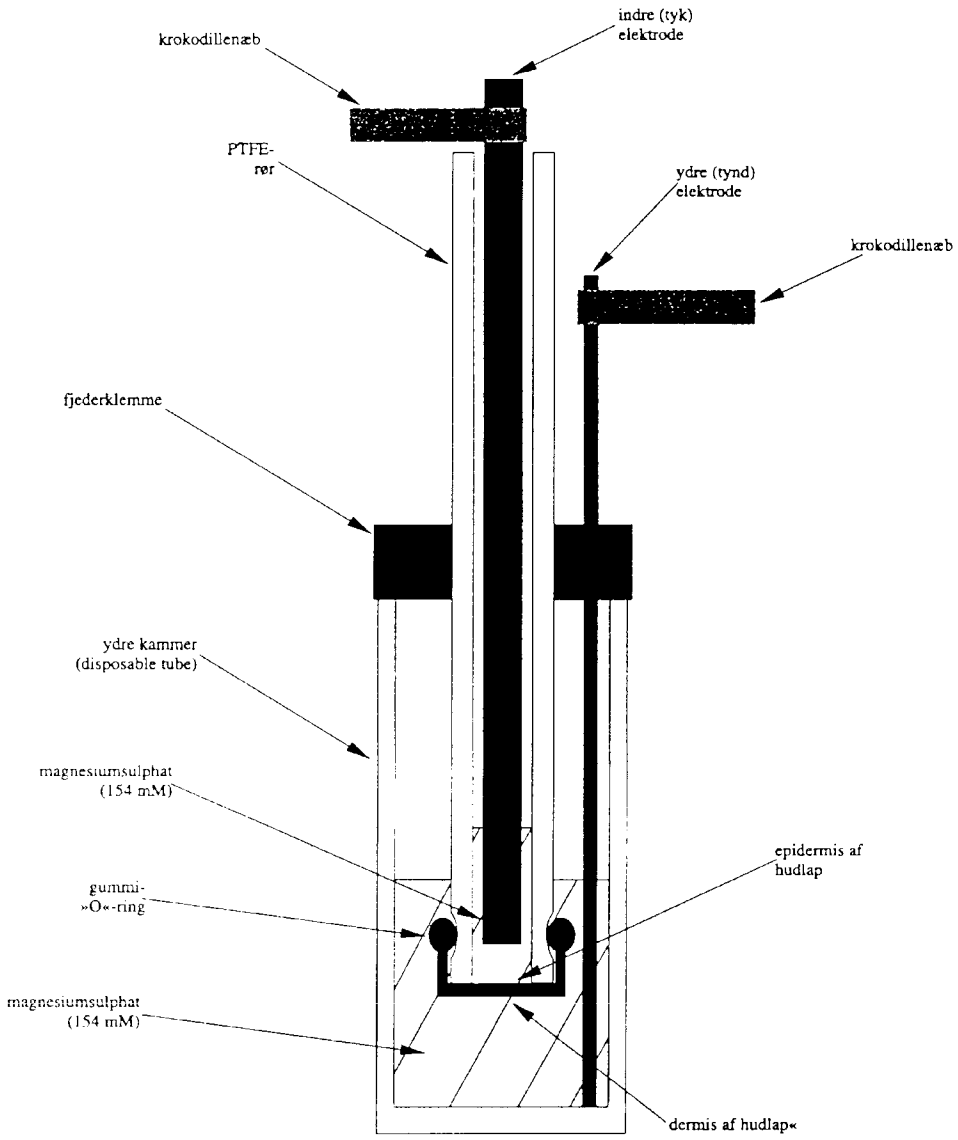


Elektroders mål



Figur 2

Apparatur til rottehud-TER-test



»B.41. FOTOTOKSICITET — IN VITRO 3T3 NRU-FOTOTOKSICITETSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

Fototoksicitet defineres som det toksiske respons, der fremkaldes på huden, efter at den har været udsat for bestemte kemiske stoffer og en påfølgende eksponering for lys, eller som det respons, der fremkaldes ved bestråling af huden efter systemisk indgift af et kemisk stof.

Resultater fra in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten bruges til identifikation af et stofs fototoksiske potentiale, dvs. påvisning af eventuel risiko ved teststoffet i forbindelse med bestråling med UV-lys og synligt lys.

Eftersom påvisning af fotocytotoksicitet induceret af den kombinerede virkning af et kemisk stof og lys er det toksikologiske slutprodukt af in vitro-testen, kan den identificere stoffer, der er fototoksiske in vivo efter systemisk indgift og fordeling i huden, og stoffer, som forårsager fotoirritation efter lokal applikation på huden.

In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten blev udviklet og valideret i et fælles EU/COLIPA-projekt fra 1992-1997 (1) (2) (3) med det formål at finde frem til et pålideligt in vitro-alternativ til de forskellige in vivo-test, der blev anvendt. I 1996 anbefalede en OECD-workshop at anvende in vitro-metoder til vurdering af fototoksicitet (4).

Resultater fra in vitro NRU-fototoksicitetstesten blev sammenlignet med akutte fototoksicitets-/fotoirritationsvirkninger på dyr og mennesker, og testen har vist sig fortræffelig til at forudsige disse virkninger. Testen er ikke beregnet til påvisning af andre negative virkninger af den kombinerede effekt af kemiske stoffer og lys, f.eks. fotogenotoksicitet, fotoallergi og fotocarcinogenicitet, selv om mange kemikalier med de nævnte egenskaber vil give et positivt resultat med in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten. Dertil kommer, at testen ikke er beregnet til vurdering af styrken af fototoksicitet.

En fremgangsmåde til vurdering af kemikaliers toksicitet vises trinvist i tillægget.

1.2. Definitioner

Strålingsintensitet: (irradiance) intensiteten af ultraviolet (UV) eller synligt lys som falder på en overflade, målt i W/m^2 eller mW/cm^2.

Lysdosis: mængden (= intensitet × tid) af ultraviolet (UV) eller synlig stråling, som falder på en overflade, udtrykt i joule (= W × s) pr. overfladeenhed, f.eks. J/m^2 eller J/cm^2.

Bølgelængder for UV-lys: betegnelser anbefalet af CIE (»Den Internationale Belysningskommission«): UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) og UVC (100-280 nm). Også andre betegnelser bruges: grænsen mellem UVB og UVA placeres ofte ved 320 nm, og UVA bliver sommetider opdelt i UV-A1 og UV-A2, med en grænse ved ca. 340 nm.

Cellernes levedygtighed: parameter, der måler en cellepopulations totale aktivitet (f.eks. farvestoffet Neutral Red's optagelse i levende cellers lysosomer), som, afhængigt af målemetode og testens udformning, korrelerer med det totale antal celler og/eller deres levedygtighed.

Cellernes relative levedygtighed: cellernes levedygtighed udtrykt i forhold til negative kontroller (opløsningsmiddel), som har været gennem hele testproceduren (enten + UV eller − UV), men som ikke er behandlet med et kemisk stof.

Forsøgsmodel, der skal udsige noget om stoffers virkning: en algoritme til beregning af toksisk potentiale ud fra resultaterne af toksicitetstesten. I nærværende retningslinier kan PIF og MPE anvendes til beregning af det fototoksiske potentiale ud fra resultaterne fra in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten.

PIF (fotoirritationsfaktor): en faktor, beregnet ud fra sammenlignende målinger af to lige effektive (EC_{50}) cytotoksiske koncentrationer af teststoffet, ved fravær (− UV) eller tilstedeværelse (+ UV) af en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

MPE (gennemsnitlig lyseffekt): en ny parameter afledt af matematisk analyse af to responskurvers totale udstrækning fremkommet ved fravær (− UV) eller tilstedeværelse (+ UV) af en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

Fototoksicitet: et akut, toksisk respons, der opnås efter førstegangsudsættelse af huden for bestemte stoffer og påfølgende lyspåvirkning, eller som induceres ved bestråling af huden efter systemisk indgift af et kemisk stof.

Fotoirritation: en underafdeling af udtrykket »fototoksicitet«, som kun beskriver hudens fototoksiske reaktioner på kemikalier, administreret lokalt eller oralt. Disse fototoksiske reaktioner medfører altid uspecifikke celleskader (svarende til solskoldethed).

Fotoallergi: en erhvervet immunologisk reaktionsevne, som ikke fremkommer efter den første behandling med kemikaliet og lys, men hvor hudens reaktionsevne først kan påvises efter en induktionsperiode på 1-2 uger.

Fotogenotoksicitet: et genotoksisk respons fra gener efter udsættelse af celler for en ikke-genotoksisk dosis af UV/synligt lys og et ikke-genotoksisk kemikalie.

Fotocarcinogenicitet: carcinogenicitet induceret ved gentagne applikationer af kemikalie og lys. Udtrykket »foto co-carcinogenese« anvendes, hvis UV-induceret tumordannelse forøges af et kemikalie.

1.3. Referencestoffer

Ud over som positiv kontrol at teste Chlorpromazin sideløbende hver gang, anbefales det med henblik på nyetablering af 3T3 NRU-fototoksicitetstesten som referencestoffer at anvende et udvalg af de kemikalier, der er anvendt i de ringprøverne af denne test (1) (3) (13).

1.4. Indledende betragtninger

Mange kemikalietyper er blevet rapporteret som fototoksiske (5) (6) (7) (8). Det eneste fælles træk er deres evne til at absorbere lysenergi fra sollys. Ifølge fotokemiens første lov (Grotthaus-Draper's lov) kræver en fotoreaktion tilstrækkelig absorption af lyskvanter. Før en biologisk testning udføres efter nærværende retningslinier, bør kemikaliets absorptionsspektrum for UV/synligt lys fastlægges (f.eks. efter OECD Test Guideline 101). Hvis den molære ekstinktions/absorptionskoefficient er mindre end 10 liter × mol^{-1} × cm^{-1} har kemikaliet ikke noget fotoreaktivt potentiale, og det er overflødigt at undersøge det med in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten eller nogen anden biologisk test med henblik på påvisning af fotokemisk effekt (tillæg).

1.5. Testmetodens princip

Man har identificeret fire forskellige mekanismer, hvorved et (kemisk) farvelegeme ved lysabsorption kan fremkalde et fototoksisk respons (7). Alle fire medfører cellebeskadigelse. In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten er derfor baseret på sammenligning af et kemisk stofs cytotoksicitet, når det ved undersøgelsen udsættes eller ikke udsættes for UVA/synligt lys i en dosis, der ikke i sig selv er cytotoksisk. Cytotoksicitet forstås i denne test som koncentrationsafhængig reduktion af optagelse af farvestoffet Neutral Red (NR (9)) 24 timer efter behandling med teststoffet og bestråling.

Balb/c 3T3-celler dyrkes i 24 timer, så der dannes et encellet lag. To mikrotiterplader med 96 brønde hver anvendes pr. teststof. Pladerne præinkuberes med 8 forskellige koncentrationer af det teststoffet i en time. En af pladerne bliver derefter udsat for ikke-cytotoksisk UVA/synligt lys i en dosis på 5 J/cm^2 UVA (+UV-eksperiment), mens den anden plade lægges mørkt (−UV-eksperiment). Derefter erstattes behandlingsmediet med dyrkningsmediet på begge plader, og efter 24 timers inkubation bestemmes cellelevedygtigheden ved den mængde af Neutral Red, der optages (NRU) i løbet af 3 timer. Den relative cellelevedygtighed, udtrykt som procent af de ubehandlede negative kontroller, beregnes for hver af de 8 testkoncentrationer. Med henblik på vurdering af den fototoksiske styrke sammenlignes det koncentrationsafhængige respons med (+UV) eller uden (−UV) bestråling, almindeligvis på EC_{50}-niveauet, dvs. ved den koncentration, som nedsætter cellelevedygtigheden med 50 % i forhold til de ubehandlede kontroller.

1.6. Kvalitetskriterier

Cellernes UVA-følsomhed, historiske data: cellernes følsomhed for UVA bør kontrolleres regelmæssigt. Cellerne udsås med samme tæthed som bliver anvendt i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, bestråles den følgende dag med UVA-doser på 1-9 J/cm^2, og cellelevedygtigheden måles næste dag med NRU-testen. Kvalitetskravet er, at levedygtigheden efter bestråling med 5 J/cm^2 ikke er mindre end 80 % af kontrollen, som var opbevaret mørkt. Ved den højeste UVA dosis på 9 J/cm^2 skal levedygtigheden ikke være mindre end 50 % af den mørke kontrol. Denne kontrolundersøgelse bør gentages for ca. hver 10. cellegeneration.

UVA-følsomhed i den negative kontrol, den foreliggende test: kvalitetskravet er, at den negative kontrol (celler i Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) med eller uden 1 % dimethylsulphoxid (DMSO) eller 1 % ethanol (EtOH)) i +UVA-eksperimentet udviser en cellelevedygtighed, som ikke er mindre end 80 % af de ikke-bestrålede celler i samme opløsning i det parallelt løbende forsøg i mørke (−UVA).

Levedygtighed i de negative kontroller: den absolutte optical density/extinction ($OD_{540\ NRU}$) målt i ekstraktet af NR fra den negative kontrol angiver om de 1×10^4 celler udsåede pr. brønd er vokset med normal fordoblingstid i undersøgelsens to døgn. En undersøgelse accepteres, hvis den gennemsnitlige $OD_{540\ NRU}$ i de ubehandlede kontroller er ≥ 0,2

Positiv kontrol: et kendt fototoksisk kemikalie skal testes sideløbende med hver in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest. Chlorpromazin (CPZ) blev anvendt som positiv kontrol i EU/COLIPA-valideringsundersøgelsen og anbefales derfor. Nedenstående kriterier blev defineret for accept af testen udført med CPZ i standardproceduren i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten: CPZ bestrålet (+UVA): EC_{50} = 0,1 til 2 µg/ml, CPZ ikke-bestrålet (−UVA): EC_{50} = 7,0 til 90,0 µg/ml. Fotoirritationsfaktoren (PIF), dvs. ændring af EC_{50}, bør være mindst 6.

Andre kendte fototoksiske kemikalier, der passer til teststoffets kemiske gruppe eller opløselighedskarakteristik, kan anvendes som sideløbende positiv kontrol i stedet for CPZ. I så fald skal højeste og laveste værdier for EC_{50} og PIF eller MPE (gennemsnitlig lyseffekt) være tilstrækkeligt definerede som kriterier for accept af testen.

1.7. Beskrivelse af testmetoden

1.7.1. *Forberedelser*

1.7.1.1. Celler

En stabil musefibroblastcellelinje — Balb/c 3T3, klon 31 — enten fra ATCC eller fra ECACC blev brugt i valideringsundersøgelsen og anbefales derfor. Andre celler kan med held anvendes med samme testfremgangsmåde, hvis dyrkningsbetingelserne er tilpasset disse cellers særlige behov, men det er nødvendigt at bevise deres ækvivalens.

Cellerne må regelmæssigt undersøges for kontamination med mycoplasma og må kun anvendes, hvis en sådan undersøgelse falder tilfredsstillende ud.

Eftersom følsomheden for UVA har tendens til at forøges med antallet af cellegenerationer, bør Balb/c 3T3-celler med det lavest mulige antal foretrækkes, fortrinsvis mindre end 100. Det er vigtigt, at Balb/c 3T3-cellernes UVA-følsomhed kontrolleres regelmæssigt, som beskrevet under kvalitetskontrol i disse retningslinier.

1.7.1.2. Medier og dyrkningsbetingelser

Passende dyrkningsmedier og inkubationsbetingelser bør anvendes til rutinedyrkning af celler og under testen. For Balb/c 3T3-cellers vedkommende er det DMEM, suppleret med 10% serum fra nyfødte kalve, 4 mM glutamin, penicillin og streptomycin og en inkubation i fugtig atmosfære ved 37 °C /7,5% CO_2. Det er specielt vigtigt, at betingelserne for dyrkning sikrer at tiden for cellecyklus er indenfor det normale for cellerne.

1.7.1.3. Fremstilling af cellekulturer

Nedfrosne celler sås i et dyrkningsmedium med en passende tæthed og subkultur anlagt mindst én gang, før de bliver anvendt i en in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest.

Til brug i fototoksicitetstesten sås cellerne ud i et dyrkningsmedium med en sådan tæthed, at cellekulturen ikke konfluerer ved testens afslutning, dvs. når cellelevedygtigheden måles 48 timer efter udsåning af cellerne. For Balb/c 3T3-celler på en mikrotiterplade med 96 brønde er den anbefalede celletæthed 1×10^4 pr. brønd.

For hvert teststof udsås celler på samme måde i to forskellige mikrotiterplader med 96 brønde, og de føres sideløbende igennem hele testproceduren under identiske dyrkningsbetingelser, bortset fra den tid, hvor den ene plade bestråles (+UVA/synligt lys) og den anden anbringes i mørke (−UVA/synligt lys).

1.7.1.4. Metabolisk aktivering

Medens det for alle in vitro-test til påvisning af genotoksisk og carcinogenotoksisk potentiale er nødvendigt at anvende et stofskifteaktiverende system, kendes der, for så vidt angår fototoksicitet, endnu ikke noget kemikalie, der kræver et sådant stofskifteaktiverende system for at kunne fungere som et fototoksin in vivo eller in vitro. Det er således ikke i nærværende test hverken nødvendigt eller videnskabeligt berettiget at anvende et stofskifteaktiverende system.

1.7.1.5. Teststof/fremstilling

Teststoffer skal være frisk fremstillede lige før brugen, medmindre data for deres stabilitet påviser, at opbevaring kan accepteres. Fremstilling under rødt lys kan være nødvendigt, dersom hurtig fotodegradation kan finde sted.

Teststofferne bør opløses i saltvand med stødpudevirkning, f.eks. Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) eller fysiologisk saltvand med phosphatstødpude (PBS), som, for at undgå interferens under bestrålingen, ikke må indeholde proteinkomponenter eller lysabsorberende pH-indikatorer.

Testkemikalier med begrænset opløselighed i vand bør opløses i passende opløsningsmiddel i 100 gange den ønskede slutkoncentration og derefter fortyndes 1:100 med stødpude-saltopløsning. Hvis der anvendes opløsningsmiddel, skal det forefindes i et konstant volumen på 1 % (v/v) i alle kulturer, dvs. i de negative kontroller såvel som i alle fortyndinger af teststoffet.

Dimethylsulphoxid (DMSO) og ethanol (EtOH) anbefales som opløsningsmidler. Andre opløsningsmidler med lav cytotoksicitet (f.eks. acetone) kan være passende, men de skal omhyggeligt undersøges for særlige egenskaber, f.eks. reaktion med teststoffet, quenching af den fototoksiske effekt, evnen til at opfange radikaler.

Vortexblanding og/eller ultralydbehandling og/eller opvarmning til 37 °C kan anvendes for at øge opløsningsprocessen.

1.7.1.6. UV-bestråling/fremstilling

Lyskilde: valget af en passende lyskilde med passende filter er den mest afgørende faktor i testning for fototoksicitet. UVA og synligt lys ledsages almindeligvis af fotosensibilisering (7) (10), mens UVB er mindre relevant og direkte stærkt cytotoksisk i stigende grad op til 1000 gange fra 313 til 280 nm (11). Som kriterium for valg af den rigtige lyskilde er det vigtigt, at lyskilden udsender bølgelængder, som absorberes af teststoffet, og at lysdosis (opnået indenfor en rimelig tid) er tilstrækkelig til påvisning af stoffer, der er kendt for fotosensibilisering. Yderligere bør de anvendte bølgelængder og doser, inklusive varmepåvirkning (infrarødt lys), ikke være unødigt skadelige for testsystemet.

Lamper med kunstigt sollys regnes for den optimale lyskilde. Lys fra både xenon- og (doteret) kviksølvmetalhalidlysbuer bruges. Sidstnævnte har den fordel, at den udsender mindre varme og er billigere, men den matcher ikke sollyset perfekt. Eftersom alle kunstige sollyskilder udsender betydelige mængder UVB, bør de forsynes med passende filtre for at svække de meget toksiske UVB-bølgelængder.

Til in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten bør et bestrålingsspektrum praktisk taget uden UVB anvendes (UVA:UVB ~ 1:20). Et eksempel på den spektrale strålingsfordeling fra det i valideringsundersøgelsen af in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten anvendte kunstige sollys er offentliggjort (3).

Dosimetri: strålingsintensiteten (irradiance) skal regelmæssigt checkes før hver test for fototoksicitet, ved hjælp af et passende bredbåndet UV-meter. UV-meteret skal være kalibreret til lyskilden. Dets funktionsevne skal checkes, til hvilket formål brugen af et reference UV-meter af samme type og identisk kalibrering anbefales. Ideelt er det med større intervaller at bruge et spektroradiometer for at måle den spektrale strålingsintensitet fra den med filter forsynede lyskilde og for at checke kalibreringen af det bredbåndede UV-meter, men til anvendelse af sådant apparatur kræves passende uddannet personale.

En dosis på 5 J/cm^2 UVA blev i valideringsundersøgelsen fastlagt som værende uden cytotoksisk effekt på Balb/c 3T3-celler og tilstrækkeligt kraftig til at aktivere selv svagt fototoksiske kemikalier. For at opnå 5 J/cm^2 inden for en periode på 50 minutter skal strålingsintensiteten sættes til 1,666 mW/cm^2. Hvis man anvender andre celler eller en anden lyskilde, skal UVA-dosis rettes til, så den ikke er skadelig for cellerne, men tilstrækkelig til at påvise standardfototoksiner. Lyseksponeringstiden beregnes på følgende måde:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{lysdosis (J/cm}^2) \times 1000}{\text{strålingsintensitet (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{W sec})$$

1.7.2. *Testbetingelser*

Højeste koncentration af et teststof bør ikke overskride 100 µl/ml, idet alle fototoksiske kemikalier er fundet ved brug af lavere koncentrationer, medens højere koncentrationer har tendens til at give falsk positive resultater (13). PH i opløsningen med den højeste koncentration af teststoffet bør for at være rimelig ligge mellem 6,5 og 7,8.

De forskellige koncentrationer af et teststof med (+UVA) eller uden (–UVA) lys bør fastlægges i et forudgående forsøg. Koncentrationerne, deres intervaller og deres højeste og laveste grænse skal justeres sådan, at koncentration/respons-kurverne er tilstrækkeligt underbygget af de eksperimentelle data. Geometrisk fortyndingsrække (med en konstant fortyndingsfaktor) bør anvendes.

1.7.3. *Fremgangsmåde* [1]

1.7.3.1. 1. dag

Der fremstilles en suspension af 1×10^5 celler/ml i et kulturmedium. 100 µl af det rene kulturmedium afpipetteres i de perifere brønde i en mikrotiterplade med 96 brønde til vævskultur, disse udgør de negative kontroller. I de resterende brønde afpipetteres 100 µl af cellesuspensionen med 1×10^5 celler/ml (= 1×10^4 celler/brønd). Der fremstilles 2 plader pr. teststof, den ene til bestemmelse af cytotoksicitet (–UVA) og den anden til bestemmelse af fototoksicitet (+UVA).

Cellerne inkuberes i 24 timer (37 °C /7,5 % CO_2), indtil der har dannet sig et halvt sammenflydende enkeltlag. Denne inkubationsperiode giver cellerne mulighed for at regenerere og vedhæfte sig samt for eksponentiel vækst.

1.7.3.2. 2. dag

Efter inkubationen dekanteres kulturmediet fra cellerne, og der vaskes to gange med 150 µl EBSS/PBS pr. brønd. Der tilsættes 100 µl EBSS/PBS indeholdende den passende koncentration af teststoffet eller kun 100 µl opløsningsmiddel (negativ kontrol). Der anvendes 8 forskellige koncentrationer af teststoffet. Cellerne inkuberes med teststoffet i mørke i 60 minutter (37 °C /7,5 % CO_2).

Under +UVA-forsøget bestråles cellerne ved stuetemperatur i 50 minutter gennem låget på mikrotiterpladen med 1,7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2). Med en elektrisk vifte hindres dannelse af kondensvand under låget. Den tilsvarende –UVA-plade opbevares i mørke ved stuetemperatur ligeledes i 50 minutter.

Testopløsningen dekanteres, vaskes to gange med 150 µl EBSS/PBS. Kulturmediet erstattes med EBSS/PBS og inkuberes (37 °C /7,5 % CO_2) til næste dag (18-22 timer).

1.7.3.3. 3. dag

Mikroskopisk evaluering

Cellerne undersøges i mikroskop med fasekontrast. Forandringer i cellernes morfologi, som skyldes cytotoksiske virkninger fra teststoffet, noteres. Dette check anbefales for at udelukke fejl i forsøget, men noterne bruges ikke til evaluering af cytotoksicitet eller fototoksicitet.

Neutral Red's optagelse i cellerne

Cellerne vaskes med 150 µl forvarmet EBSS/PBS. Vaskeopløsning fjernes ved at banke let på pladen. 100 µl Neutral Red-opløsning tilsættes, inkuberes i fugtig atmosfære ved 37 °C og 7,5 % CO_2 i 3 timer.

Efter inkubationen fjernes Neutral Red-opløsningen, og cellerne vaskes med 150 µl EBSS/PBS. Der dekanteres og trykkes efter med sugende papir, så alt EBSS/PBS fjernes. (Eventuelt: pladen centrifugeres, så væsken slynges bort).

Der tilsættes nøjagtig 150 µl opløsning af frisk fremstillet ethanol/eddikesyre, som ekstraherer Neutral Red.

Mikrotiterpladen rystes hurtigt på en dertil beregnet shaker i 10 minutter, indtil al Neutral Red er fjernet fra cellerne og har dannet en homogen opløsning.

OD af Neutral Red-ekstraktet måles ved 540 nm i et spektrofotometer, med de negative kontroller som reference. Resultaterne opbevares i et passende filformat (f.eks. ASCII) med henblik på senere analyse.

---

[1] Yderligere detaljer findes i reference (12).

2. DATA

2.1. Kvalitative og kvantitative data

Resultaterne af undersøgelsen skal give mulighed for en analyse af koncentration/respons fremkommet med og uden bestråling af UVA/synligt lys. Hvis der påvises cytotoksicitet, skal man anføre højeste og laveste undersøgte koncentration, og de forskellige koncentrationer, der er anvendt, skal tilsammen indtegnes på en kurve over tallene. Da et teststof i mørke (–UVA) kan være uden cytotoksisk effekt i koncentrationer op til de 100 µg/ml, som er sat som grænse, men stærkt cytotoksisk, når det bliver bestrålet (+UVA), kan det være nødvendigt at undersøge det pågældende stof i forskellige fortyndingsrækker i de to systemer. Hvis der ikke påvises cytotoksicitet, hverken med UVA/synligt lys eller uden UVA/synligt lys, behøver man ikke anvende så mange forskellige koncentrationer i undersøgelsen.

Et klart positivt resultat kræver ikke bekræftelse i en ny undersøgelse, og det samme gælder klart negative resultater, hvis stoffet er undersøgt i tilstrækkeligt høje koncentrationer. I disse tilfælde er det tilstrækkeligt med ét forsøg, hvis der forud herfor er gennemført et eller flere forberedende forsøg, med henblik på at finde de rette koncentrationer.

Usikre resultater, der ligger nær grænseværdien, skal kontrolleres ved at gentage undersøgelsen.

Hvis det er nødvendigt at gentage en undersøgelse, kan det være påkrævet at variere forsøgsbetingelserne for at opnå et klart resultat. Af central betydning i denne sammenhæng er fremstilling af flere opløsninger med teststoffet. En ændring heri (co-solvens, blanding, ultralydbehandling) kan være særdeles relevant ved gentagelsen af en undersøgelse. Alternativt kan en ændring i inkubationstiden før bestråling overvejes. En kortere tid kan være relevant for stoffer, der er ustabile i vandig opløsning.

2.2. Behandling af resultaterne

Hvor det er muligt, fastlægges den koncentration af teststoffet, der giver en 50 % hæmning af celle-NRU (EC_{50}). Dette kan gøres ved anvendelse af passende ikke-lineær regression (fortrinsvis en Hill-funktion eller logistisk regression) på koncentration/respons-data eller andre passende procedurer (14). Før EC_{50} anvendes til videre beregninger, skal beregningerne checkes. Alternativt kan beregningen af EC_{50} foretages grafisk. Det anbefales at anvende sandsynlighedspapir (x-akse: log, y-akse: probit), da koncentration/respons-funktionen ofte vil være næsten lineær efter denne transformation.

2.3. Evaluering af resultaterne (forsøgsmodeller, der skal forudsige noget om stoffers virkning)

2.3.1. *Forsøgsmodel 1, der skal forudsige noget om fotoirritationsfaktoren (PIF)*

Hvis der opnås komplette koncentration/respons-kurver både med lys (+UVA) og uden (–UVA) lys, kan fotoirritationsfaktoren (PIF) beregnes efter følgende formel:

(a) $$PIF = \frac{EC_{50}\ (-\ UV)}{EC_{50}\ (+\ UV)}$$

PIF < 5 peger ikke på noget fototoksisk potentiale, mens PIF ≥ 5 pege på fototoksisk potentiale.

Hvis et kemikalie kun er cytotoksisk +UVA, men ikke ved undersøgelsen –UVA, kan PIF ikke beregnes, selv om resultatet peger på et fototoksisk potentiale. I sådanne tilfælde kan »> PIF« beregnes, hvis (–UV)-cytotoksicitetstesten udføres til og med den højeste testkoncentration (C_{max}), og denne værdi anvendes til beregningen af »> PIF«:

(b) $$> PIF = \frac{C_{max}\ (-\ UV)}{EC_{50}\ (+\ UV)}$$

Hvis målingerne kun viser »> PIF«, peger enhver værdi > 1 på et fototoksisk potentiale.

Hvis hverken EC_{50} (–UV) og EC_{50} (+UV) kan beregnes, fordi kemikaliet selv ikke i den højeste testkoncentration udviser cytotoksicitet, er der ikke tale om et fototoksisk potentiale. I sådanne tilfælde anvendes et formelt »PIF = *1« til at karakterisere resultatet.

(c) $$PIF = *1 = \frac{C_{max}\ (-\ UV)}{C_{max}\ (+\ UV)}$$

Hvis målingerne kun viser »PIF = *1«, peges der ikke på noget fototoksisk potentiale.

I tilfældene (b) og (c) skal koncentrationerne fundet i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten nøje tages i betragtning, når der peges på et fototoksisk potentiale.

2.3.2. *Forsøgsmodel 2, der skal udsige noget om den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)*

Alternativt kan anvendes en ny model til påvisning af fototoksisk potentiale. Den er blevet udviklet ud fra data opnået under EU/COLIPA-valideringsundersøgelsen (15) og blindtestet i en påfølgende in vitro-undersøgelse af UV-filterkemikaliers fototoksicitet (13). Denne model kommer uden om PIF-modellens begrænsninger i de tilfælde, hvor EC_{50} ikke kan findes. Modellen anvender den gennemsnitlige lyseffekt (MPE), et mål, som er baseret på en sammenligning af komplette koncentration/respons-kurver. Humboldt Universitetet i Berlin) har udviklet et computerprogram til MPE-modellen, som kan fås gratis.

2.4. Tolkning af resultaterne

Et positivt resultat i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten (PIF ≥ 5 eller MPE ≥ 0,1) viser, at teststoffet er fototoksisk. Hvis et sådant resultat er opnået ved koncentrationer under 10 µg/ml, er det sandsynligt, at teststoffet også in vivo er fototoksisk ved lyspåvirkning. Hvis et positivt resultat kun er opnået ved den højeste testkoncentration på 100 µg/ml, kan det være nødvendigt med yderligere overvejelser over stoffets risikoegenskaber eller fototoksicitet. Disse overvejelser kan gå på data vedrørende penetration, absorption og mulig akkumulation af stoffet i huden eller på brugen af en alternativ test, f.eks. en in vitro-hudtest med human hud, med henblik på af- eller bekræftelse af stoffets risikoegenskaber.

Et negativt resultat i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten (PIF < 5 eller MPE < 0,1) viser at teststoffet ikke er fototoksisk over for pattedyrceller dyrket på den beskrevne måde. I de tilfælde, hvor stoffet viser negative resultater helt op til den højeste koncentration på 100 µg/ml, betyder et negativt resultat, at stoffet ikke er fototoksisk, og at fototoksicitet in vivo er usandsynlig. Konklusionen vil være den samme, hvis der fremkommer identiske koncentrationstoksicitetssvar (EC_{50}+UV og EC_{50}−UV) ved lavere koncentrationer. Hvis der derimod ikke påvises toksicitet (+UV og −UV), og hvis opløseligheden i vand har begrænset den mulige koncentration til værdier under 100 µg/ml, kan man betvivle testens egnethed til det pågældende stof, og bekræftende undersøgelser må tages i betragtning (f.eks. en in vitro-hudmodel eller en ex vivo-hudmodel eller en in vivo-test).

3. RAPPORTERING

Testrapport

Testrapporten skal indeholde følgende information:

Teststoffet:

— Identifikationsdata og CAS-nummer, hvis kendt

— Fysiske egenskaber og renhedsgrad

— Fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen

— Stabilitet og fotostabilitet, hvis kendt

Opløsningsmiddel:

— Begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— Teststoffets opløselighed i opløsningsmidlet

— Mængden (i procent) af opløsningsmiddel i kulturmediet (EBSS eller PBS)

Celler:

— Celletype og oprindelse

— Fravær af mycoplasma

— Antal generationer, hvis kendt

— Cellernes følsomhed for UVA, målt med det strålingsudstyr, som anvendes i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten

Testbetingelser (a): inkubation før og efter udsættelsen for kemikaliet:

— Type og sammensætning af dyrkningsmediet

— Omstændigheder ved inkubationen (CO_2-koncentration, temperatur, fugtighed)

— Varighed af inkubationen (før og efter udsættelsen for kemikaliet)

Testbetingelser (b); udsættelsen for kemikaliet

— Begrundelse for valg af koncentrationer af teststoffet både med og uden bestråling med UV/synligt lys

— Begrundelse for den største koncentration anvendt ved undersøgelsen, dersom stoffet er tungtopløseligt, og cytotoksicitet ikke er påvist

— Type og sammensætning af behandlingsmediet (stødpude-salt-opløsningen)

— Varigheden af udsættelsen for det kemiske stof

Testbetingelser (c); bestråling

— Begrundelse for valget af lyskilde

— Lyskildens spektrale strålingskarakteristik

— Det (de) anvendte filterfiltres transmission/absorptions-karakteristik

— Det anvendte spektroradiometers karakteristik og detaljeret beskrivelse af dets kalibrering

— Afstanden mellem lyskilden og testsystemet

— UVA-strålingsintensiteten (irradiance) for den pågældende afstand udtrykt i mW/cm^2

— Varigheden af udsættelsen for UV/synligt lys

— UVA-dosis (strålingsintensitet × tid) udtrykt i J/cm^2

— Temperaturen i cellekulturen under bestrålingen og den tilsvarende cellekultur samtidigt opbevaret i mørke

Testbetingelser (d); NRU-testen

— Sammensætning af Neutral Red-mediet

— Varigheden af inkubationen med NR

— Omstændigheder ved inkubationen (CO_2-koncentration, temperatur, fugtighed)

— Omstændighederne ved ekstraktion af NR (ekstraktionsmiddel, varighed)

— Bølgelængde anvendt ved den spektrofotometriske aflæsning af OD (ekstinktionen) for NR

— Angivelse af eventuel referencebølgelængde

— Indholdet i brønden anvendt til eventuel måling af negative kontroller

Resultater

— Cellelevedygtighed for hver koncentration af teststoffet udtrykt som procent af levedygtigheden i kontrollerne

— Koncentration/respons-kurver (koncentration af teststoffet over for den relative cellelevedygtighed), fremkommet i samhørende eksperimenter, +UVA og −UVA

— Analyse af data af kurverne over koncentration/respons; hvis muligt beregning/kalkulation af EC_{50} (+UVA) og EC_{50} (−UVA)

— Sammenligning af de to koncentration/respons-kurver, som er fremkommet ved bestråling med og uden UVA/synligt lys, enten ved beregning af fotoirritationsfaktor (PIF), eller beregning af den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)

— Klassifikation af fototoksiciteten

— Kriterier for accept af test (a), samtidig negativ kontrol:

  — Absolut levedygtighed (ekstinktion (OD) for NR-ekstraktet) for bestrålede og ikke-bestrålede celler

  — Forklarende data for den negative kontrol, gennemsnit og standarddeviation

— Kriterier for accept af test (b), samtidig positiv kontrol:

  — EC_{50} (+UVA) og EC_{50} (−UVA) og PIF for den positive kontrols kemikalie

  — forklarende data for den positive kontrols kemikalie: EC_{50} (+UVA) og EC_{50} (−UVA) og PIF, gennemsnit og standarddeviation

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. REFERENCER

(1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, s. 793-796.

(2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, s. 7-8.

(3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA »*In vitro* phototoxicity« validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, s. 305-327.

(4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.

(5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, s. 95-102.

(6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, s. XI-XXXV.

(7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, s. 314-348.

(8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, s. 79-110.

(9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, s. 119-124.

(10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, s. 515-530.

(11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, s. 1825-1829.

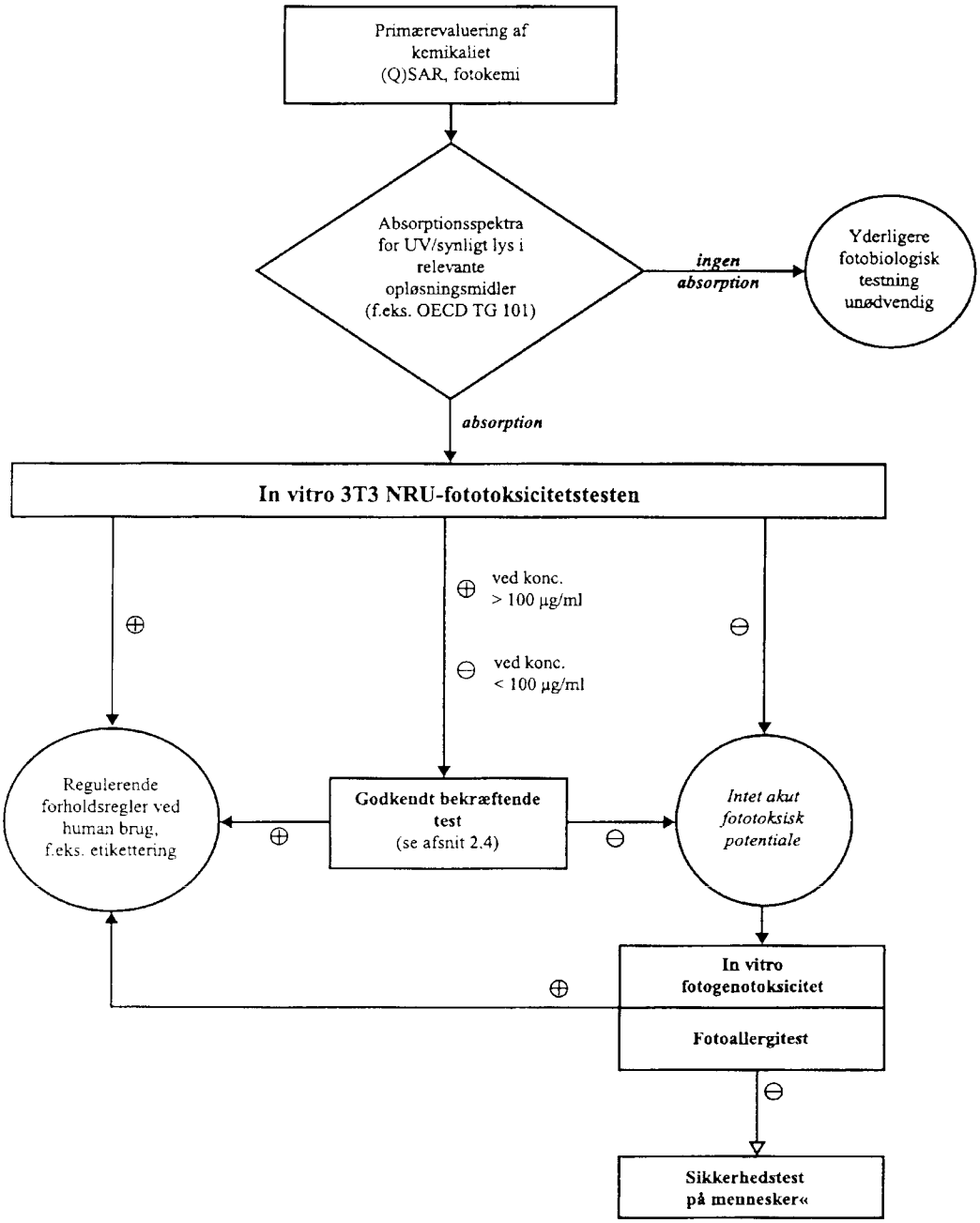
(12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project »*In Vitro* Photoirritation«.

(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, s. 679-708.

(14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, s. 127-138.

(15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, s. 445-462.

3T3 NRU-fototoksicitetstestens rolle i et sekvensskema til testning af kemikaliers fototoksicitet



DA

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER

Bruxelles, den 29.10.2003
KOM(2003) 644 endelig

2003/0256(COD)
2003/0257(COD)

DEL V - Bilag X del C til forslaget til forordning

.

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS FORORDNING

om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) {om persistente organiske miljøgifte}

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

(forelagt af Kommissionen)

{SEC(2003 1171}

AFSNIT C: METODER TIL BESTEMMELSE AF ØKOTOKSICITET

C.1. AKUT TOKSICITET FOR FISK

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne test er at bestemme et stofs akutte dødelige toksicitet for ferskvandsfisk. Det er ønskeligt at have flest mulige oplysninger om stoffets vandopløselighed, damptryk, kemiske stabilitet, dissociationskonstanter og bionedbrydelighed, når man skal vælge, med hvilken testmetode (statisk, semistatisk eller gennemløb) der mest hensigtsmæssigt kan opnås tilfredsstillende konstante koncentrationer af teststoffet under testens forløb.

Øvrige oplysninger (f.eks. strukturformel, renhedsgrad, art og procentdel af betydende urenheder, tilstedeværelse og mængde af tilsætningsstoffer, samt n-octanol/vand-fordelingskoefficienten) bør tages i betragtning både ved planlægningen af testen og ved fortolkningen af testresultaterne.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Akut toksicitet er erkendbar skadelig virkning, der fremkaldes hos en organisme inden for kort tid (dage) ved eksponering for et stof. I denne test udtrykkes akut toksicitet som middel dødelig koncentration (LC_{50}), dvs. den koncentration i vand, som dræber 50 % af fiskene i en forsøgsgruppe under kontinuerlig eksponering i en vis periode, som skal angives.

Alle koncentrationer af teststoffet er angivet i vægt pr. volumenenhed (mg/l). De kan også udtrykkes i vægtforhold (mg/kg).

1.3. REFERENCESTOFFER

Der kan anvendes et referencestof til at godtgøre, at forsøgsdyrenes følsomhed ikke har ændret sig væsentligt under forsøgsbetingelserne i laboratoriet.

Der er ikke specificeret nogen referencestoffer til denne test.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Der kan udføres en grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om LC_{50} er større end denne koncentration.

Fiskene udsættes for teststoffet i vand i en række koncentrationer i 96 timer. Dødeligheden registreres med højst 24 timers mellemrum, og man beregner om muligt de koncentrationer, der på hvert observationstidspunkt dræber 50 % af fiskene (LC_{50}).

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierne gælder for såvel grænsetesten som den komplette testmetode.

Dødeligheden i kontrolgruppen må ikke overstige 10 % (eller 1 fisk hvis der benyttes mindre end 10 fisk) ved testens afslutning.

Koncentrationen af opløst oxygen skal være højere end 60 % af mætning gennem hele testen.

Koncentrationen af teststoffet skal ligge over 80 % af startkoncentrationen gennem hele testen.

For stoffer, der let opløses i testmediet og giver stabile opløsninger, dvs. stoffer, der ikke i væsentlig grad fordamper, nedbrydes, hydrolyseres eller adsorberes, kan startkoncentrationen antages at være lig med den nominelle koncentration. Det skal godtgøres, at koncentrationen har været opretholdt gennem hele testen, og at kvalitetskriterierne er opfyldt.

For stoffer, som

(i) er tungt opløselige i testmediet eller

(ii) kan danne stabile emulsioner eller dispersioner eller

(iii) er ustabile i vandig opløsning,

skal der som værdi for startkoncentrationen anvendes den koncentration, som er målt i opløsningen (eller hvis dette ikke er teknisk muligt, målt i vandsøjlen) ved testens begyndelse. Koncentrationen bestemmes efter, at der opnået ligevægt, men førend testfisk kommes i.

I alle disse tilfælde skal yderligere målinger foretages i løbet af testen for at sikre at koncentrationen har været opretholdt eller kvalitetskriterierne har været opfyldt.

pH må ikke variere med mere end 1 enhed.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Der kan anvendes tre typer procedurer:

Statisk test:

Toksicitetstest hvor der ikke foregår gennemløb af testopløsning. (Opløsningerne udskiftes ikke under testens forløb.)

Semi-statisk test:

Test uden gennemløb af testopløsning, men hvor hele testopløsningen udskiftes med regelmæssige lange mellemrum (f.eks. hver 24. time).

Gennemstrømningstest:

Toksicitetstest, hvor vandet i testkamrene løbende udskiftes, og hvor teststoffet transporteres med udskiftningsvandet.

1.6.1. Reagenser

1.6.1.1. *Teststofopløsninger*

Der fremstilles stamopløsninger af den påkrævede styrke ved opløsning af stoffet i deioniseret vand eller vand som beskrevet i 1.6.1.2.

De valgte testkoncentrationer fremstilles ved fortynding af stamopløsningen. Hvis der testes høje koncentrationer, kan stoffet opløses direkte i det vand, der ellers anvendes til fortynding.

Stoffer testes normalt kun op til opløselighedsgrænsen. For visse stoffer (f.eks. stoffer, som er tungt opløselige i vand, som har en høj P_{ow}-værdi, eller som danner en stabil dispersion og ikke en ægte opløsning i vand) kan det accepteres, at der anvendes en testkoncentration, der er større end opløseligheden, så det sikres, at den højeste opløste/stabile koncentration er nået. Det er dog vigtigt, at denne koncentration ikke på anden måde forstyrrer testsystemet (f.eks. dannelse af en hinde af stoffet på vandoverfladen, så vandet ikke iltes, osv.).

Der kan tages ultralyd, organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler til hjælp til fremstilling af stamopløsninger af stoffer, der er tungt opløselige i vand, og til dispergering af sådanne stoffer i testmediet. Hvis der anvendes hjælpestoffer, skal alle testkoncentrationer indeholde samme mængde hjælpestof,

og der anvendes en ekstra kontrolgruppe, der udsættes for samme koncentration af hjælpestoffet, som er anvendt i testserien. Sådanne hjælpestoffer anvendes i den lavest mulige koncentration, der i hvert tilfælde ikke må være større end 100 mg/l i testmediet.

Testen gennemføres uden justering af pH. Hvis der konstateres en væsentlig pH-ændring, anbefales det at gentage testen med justeret pH, og disse resultater rapporteres. I så fald justeres stamopløsningens pH til samme værdi som i det vand, der anvendes til fortynding, medmindre der er særlige grunde til at undlade dette. Til justering af pH foretrækkes HCl og NaOH. Justering af pH skal foregå på en sådan måde, at koncentrationen af teststof i stamopløsningen ikke ændres væsentligt. Hvis teststoffet reagerer kemisk eller udfældes ved justeringen, rapporteres dette.

1.6.1.2. *Vand til opbevaring og fortynding*

Der kan benyttes drikkevand (ikke forurenet med potentielt skadelige koncentrationer af chlor, tungmetaller eller andre stoffer), råvand af egnet kvalitet eller kunstigt fremstillet ferskvand (se tillæg 1). Der foretrækkes vand med en total hårdhed mellem 10 og 250 mg/l (som $CaCO_3$) og med et pH mellem 6,0 og 8,5.

1.6.2. **Apparatur**

Alt apparatur skal være af kemisk inert materiale.

— automatisk fortyndingssystem (for gennemstrømningstest)

— oxygenmåleudstyr

— udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed

— passende apparatur til temperaturkontrol

— pH-meter.

1.6.3. **Testfisk**

Fiskene skal være i god helbredstilstand og uden synlige misdannelser.

Arterne udvælges på grundlag af praktiske kriterier såsom, om de er til rådighed hele året, hvor lette de er at holde, om de er egnede til testning, og hvor følsomme de er, samt andre økonomiske, biologiske og økologiske faktorer af betydning. Hensynet til dataenes sammenlignelighed og den allerede gennemførte internationale harmonisering (reference 1) bør ligeledes tages i betragtning ved valg af fiskearterne.

Tillæg 2 indeholder en liste over de fiskearter, der anbefales til gennemførelse af denne test; zebrafisk og regnbueørred foretrækkes.

1.6.3.1. *Opbevaring*

Testfisk skal fortrinsvis komme fra en enkelt bestand og være af samme længde og alder. Fiskene skal holdes i mindst 12 dage under følgende betingelser:

Belastning:

Passende for systemet (recirkulation eller gennemstrømning) og fiskearten.

Vand:

Se 1.6.1.2.

Lys:

12 til 16 timers lys dagligt.

Koncentration af opløst oxygen:

Mindst 80 % mætning.

Fodring:

Dagligt eller tre gange ugentligt, sidste gang 24 timer før testen påbegyndes.

1.6.3.2. *Dødelighed*

Efter en 48 timers tilpasningsperiode registreres dødeligheden, og følgende kriterier anvendes:

— større end 10 % af populationen på 7 dage:
hele partiet kasseres.

— mellem 5 og 10 % af populationen:
observationsperioden forlænges med yderligere syv dage. Hvis der ikke sker flere dødsfald, accepteres partiet; i modsat fald må det kasseres.

— mindre end 5 % af populationen:
partiet accepteres.

1.6.4. **Tilvænning**

Alle fisk skal udsættes for vand af den kvalitet og med den temperatur, som vil blive anvendt i testen, i mindst syv dage, før de tages i anvendelse.

1.6.5. **Testens udførelse**

Forud for den endelige test kan der udføres en indledende test med det formål at skaffe oplysninger om, hvilke koncentrationer der skal anvendes i den endelige test.

Udover testserien medtages en kontrolgruppe uden teststof og i givet fald en kontrolgruppe med hjælpestof.

Der vælges en statisk test, en semi-statisk test eller en gennemstrømningstest alt efter teststoffets fysiske og kemiske egenskaber, idet den bedst egnede til opfyldelse af kvalitetskriterierne vælges.

Fiskene udsættes for stoffet, som beskrevet nedenfor:

— varighed: 96 timer

— antal dyr: mindst 7 pr. koncentration

— kar: af passende størrelse i forhold til den anbefalede belastning

— belastning: for statiske og semi-statiske test anbefales 1,0 g/l som den maksimale belastning; for gennemstrømningstest kan større belastning accepteres

— testkoncentration: mindst 5 koncentrationer med et konstant indbyrdes forhold på ikke over 2,2, som så vidt muligt dækker hele dødelighedsintervallet fra 0 til 100 %

— vand: se 1.6.1.2

— lys: 12 til 16 timers lys dagligt

— temperatur: passende for arten (tillæg 2) men inden for ± 1 °C i den enkelte test

— koncentration af opløst oxygen: ikke mindre end 60 % af mætning ved den valgte temperatur

— fodring: ingen.

Fiskene inspiceres efter de første 2 til 4 timer og derefter med højst 24 timers mellemrum. Fisk betragtes som døde, hvis berøring af haleroden ikke giver nogen reaktion og der ikke er synlige respirationsbevægelser. Døde fisk fjernes, når de observeres, og dødeligheden registreres.

Synlige abnormaliteter (f.eks. tab af ligevægt, ændringer i svømmeadfærd, respirationsbevægelser og pigmentering) registreres.

pH, opløst oxygen og temperatur måles dagligt.

Grænsetest

En grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om LC_{50} er større end denne koncentration kan anvendes, hvis den fremgangsmåde, som er anført i denne testmetode, benyttes.

Hvis stoffet er af en sådan art, at der ikke kan opnås en koncentration på 100 mg/l i testvandet, udføres grænsetesten ved stoffets mætningskoncentration (eller den højeste koncentration, ved hvilken der dannes en stabil dispersion) i det anvendte medium (se også 1.6.1.1).

Grænsetesten udføres med 7-10 fisk og en eller to kontrolgrupper af samme størrelse. (Ifølge binomialteorien er der ved anvendelse af 10 fisk 99,9 % sikkerhed for, at LC_{50} er større end den anvendte koncentration, hvis dødeligheden er nul. Med 7, 8 eller 9 fisk giver en dødelighed på nul 99 % sikkerhed for, at LC_{50} er større end den anvendte koncentration).

Hvis der sker dødsfald, må der gennemføres en komplet undersøgelse. Eventuelle subletale virkninger registreres.

2. DATA OG EVALUERING

For hvert af de tidspunkter, hvor der er foretaget observationer (efter 24, 48, 72 og 96 timer), afsættes den procentvise dødelighed mod koncentrationen på logaritmisk sandsynlighedspapir.

For hvert observationstidspunkt skønnes om muligt LC_{50} og konfidensgrænserne ($p = 0,05$) ved hjælp af standardprocedurer; disse værdier afrundes til ét, eller højst to betydende cifre (eksempler på afrunding til 2 cifre: 173,5 til 170; 0,127 til 0,13; 1,21 til 1,2).

I de tilfælde, hvor hældningen af koncentration/responsprocentkurven er for stejl til, at LC_{50} kan beregnes, er et skøn ud fra kurven tilstrækkeligt.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et indbyrdes forhold på 2,2 giver en dødelighed på 0 og 100 %, er disse to værdier tilstrækkelige til angivelse af, i hvilket interval LC_{50} ligger.

Hvis det bemærkes, at teststoffet ikke kan holdes stabilt eller homogent, skal dette anføres, og resultaterne må fortolkes med forsigtighed.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— oplysninger om testfisk (videnskabeligt navn, stamme, leverandør, eventuel forbehandling, størrelse samt, hvor mange der er anvendt ved hver testkoncentration)

— hvor det vand, der er anvendt til fortynding, kommer fra og dets vigtigste kemiske egenskaber (pH, hårdhed og temperatur)

— for stoffer, der er tungtopløselige i vand, hvilken metode der er anvendt til fremstilling af stam- og testopløsning

— koncentrationen af eventuelle hjælpestoffer

— en liste over de anvendte koncentrationer og alle foreliggende oplysninger om testkemikaliets stabilitet i testopløsningen ved disse koncentrationer

— metoder og resultater, hvis der er udført kemiske analyser

— resultaterne af en eventuel grænsetest

— begrundelse for og detaljer vedrørende den valgte testprocedure (f.eks. statisk, semi-statisk, doseringshastighed, gennemstrømningshastighed, beluftning, antal fisk, osv.)

— beskrivelse af testudstyret

— lysforhold

— koncentrationen af opløst oxygen, pH og temperatur i testopløsningerne hver 24. time

— godtgørelse af, at kvalitetskriterierne er opfyldt

— en tabel med den kumulative dødelighed for hver koncentration og for kontrolgruppen (samt i givet fald for kontrolgruppen med hjælpestof) på alle de anbefalede observationstidspunkter

— afbildning af koncentration/responsprocent-kurven ved testens afslutning

— om muligt LC_{50}-værdier på alle de anbefalede observationstidspunkter (med 95 % konfidensgrænser)

— hvilke statistiske metoder der er anvendt til bestemmelse af LC_{50}

— hvis der er benyttet et referencestof, de fundne resultater

— højeste testkoncentration, der ikke forårsager nogen dødsfald inden for testperioden

— laveste testkoncentration, der forårsager 100 % dødelighed inden for testperioden.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1, /2 and /3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia recticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the açute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrenvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J., Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelinck). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R. Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an C_{50}. US EPA.

Tillæg 1

Kunstigt fremstillet ferskvand

Eksempel på vand egnet til fortynding

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Vandet skal være destilleret vand af god kvalitet eller deioniseret vand med en ledningsevne på mindre end 5 μScm^{-1}.

Vanddestillationsapparatet må ikke indeholde dele af kobber.

Stamopløsninger

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (calciumchlorid dihydrat): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	11,76 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	4,93 g
$NaHCO_3$ (natriumhydrogencarbonat): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	2,59 g
KCl (kaliumchlorid): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	0,23 g

Kunstigt fremstillet ferskvand til fortynding

25 ml af hver af de fire stamopløsninger blandes, og der fortyndes til 1 liter med vand.

Opløsningen beluftes, indtil koncentrationen af opløst oxygen svarer til værdien ved mætning.

pH skal være 7,8 ± 0,2.

Om nødvendigt justeres pH med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyre).

Det således fremstillede vand til fortynding henstår i ca. 12 timer og beluftes ikke yderligere.

Summen af Ca- og Mg-ioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l. Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1 og mellem Na- og K-ioner 10:1. Opløsningens totale alkalinitet er 0,8 mmol/l.

Afvigelser ved fremstillingen af fortyndingsvandet må ikke medføre ændringer i vandets sammensætning og egenskaber.

Tillæg 2

Fiskearter, der anbefales til testning

Anbefalede arter	Anbefalet temperaturinterval (°C)	Anbefalet længde af testdyr (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk	20 til 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 til 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Karpe	20 til 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodontidae (Tomminck og Schlegel 1850) japansk risfisk	20 til 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 til 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758)	20 til 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regenbueørred	12 til 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Guldfisk	20 til 24	6,0 ± 2,0

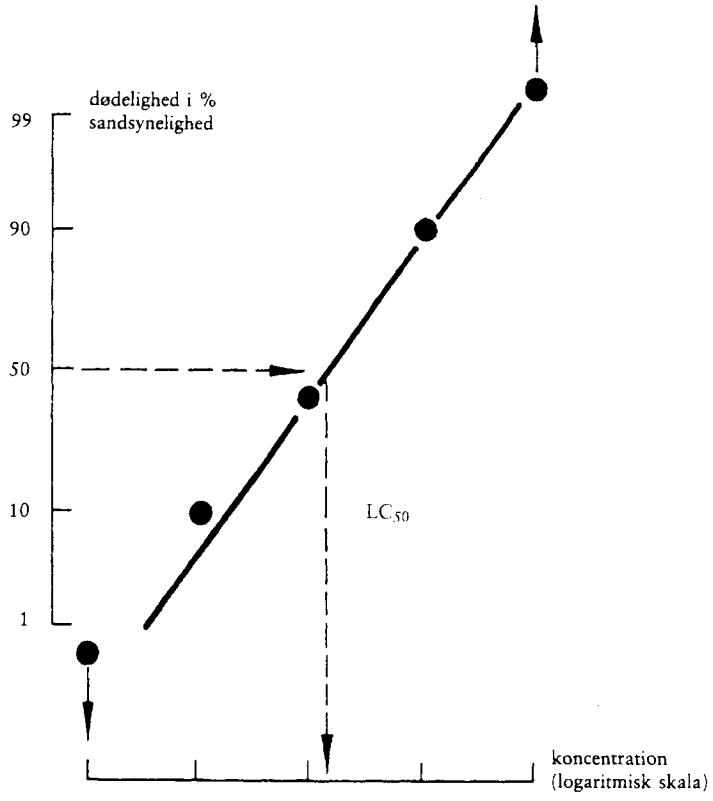
Opdrætsbetingelser

De ovenfor nævnte fisk er lette at opdrætte og/eller let tilgængelige hele året rundt. De kan opdrættes enten i dambrug eller i laboratoriet under sygdoms- og parasitfrie forhold, sådan at forsøgsdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk er tilgængelige i store dele af verden.

Tillæg 3

Eksempel på kurve over koncentration mod dødelighed

Eksempel på bestemmelse af LC_{50} på log/sandsynlighedspapir



C.2. AKUT TOKSICITET FOR DAFNIER

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne test er at bestemme et stofs effektive middelkoncentration (EC_{50}) for immobilisering af dafnier i ferskvand. Det er ønskeligt at have flest mulige oplysninger om teststoffets vandopløselighed, damptryk, kemiske stabilitet, dissociationskonstanter og bionedbrydelighed, førend testen påbegyndes.

Øvrige oplysninger (f.eks. strukturformel, renhedsgrad, art og procentdel af betydende urenheder, tilstedeværelse og mængde af tilsætningsstoffer, samt n-octanol/vand-fordelingskoefficienten) bør tages i betragtning både ved planlægningen af testen og ved fortolkningen af dens resultater.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Direktivets krav med hensyn til LC_{50} for dafnier anses for opfyldt, hvis EC_{50} bestemmes som beskrevet i denne testmetode.

Akut toksicitet udtrykkes i denne test som den effektive middelkoncentration (EC_{50}) for immobilisering. Det er den koncentration udtrykt som initialværdi ved hvilken 50 % af dafnierne i en forsøgsgruppe immobiliseres under kontinuerlig eksponering i en vis periode, som skal angives.

Immobilisering:

De dyr, der ikke er i stand til at svømme inden for 15 sekunder efter forsigtig omrøring i prøveglasset, anses for at være immobile.

Alle koncentrationer af teststoffet er angivet i vægt pr. volumenenhed (mg/l). De kan også udtrykkes i vægtforhold (mg/kg^{-1}).

1.3. REFERENCESTOFFER

Der kan anvendes et referencestof til at godtgøre, at forsøgsdyrenes følsomhed ikke har ændret sig væsentligt under forsøgsbetingelserne i laboratoriet.

Resultaterne af en EF-ringtest med 4 forskellige stoffer er sammenfattet i tillæg 2.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Der kan udføres en grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om EC_{50} er større end denne koncentration.

Dafnierne udsættes for teststoffet i vand i en række koncentrationer i 48 timer. Anvendes der en kortere test, skal dette begrundes i forsøgsrapporten.

Under i øvrigt identiske forsøgsbetingelser og i et passende koncentrationsområde vil de forskellige koncentrationer af et teststof give forskellige gennemsnitlige grader af påvirkning af dafniernes svømmedygtighed. Forskellige koncentrationer resulterer i, at forskellige procentdele af dafnierne ikke er i stand til at svømme ved afslutningen af forsøget. Koncentrationerne, der forårsager 0 og 100 % immobilisering, udledes direkte af de ved forsøget gjorte observationer, hvorimod 48-timers EC_{50} om muligt bestemmes ved beregning.

I denne metode anvendes der et statisk system, og de anvendte opløsninger udskiftes derfor ikke i testperioden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierne gælder for såvel grænsetesten som den komplette testmetode.

Immobiliseringen i kontrolgruppen må ikke overstige 10 % ved testens afslutning.

Kontrolgruppernes dafnier må ikke være fanget i vandets overflade.

Koncentrationen af opløst oxygen i testbeholderne skal helst være over 3 mg/l^{-1} gennem hele testen. Den må dog under ingen omstændigheder komme under 2 mg/l^{-1}.

Koncentrationen af teststoffet skal ligge over 80 % af startkoncentrationen gennem hele testen.

For stoffer, der let opløses i testmediet og giver stabile opløsninger, dvs. stoffer, der ikke i væsentlig grad fordamper, nedbrydes, hydrolyseres eller adsorberes, kan startkoncentrationen antages at være lig med den nominelle koncentration. Det skal godtgøres, at koncentrationen har været opretholdt høj gennem hele testen, og at kvalitetskriterierne er opfyldt.

For stoffer, som

(i) er tungt opløselige i testmediet eller

(ii) kan danne stabile emulsioner eller dispersioner eller

(iii) er ustabile i vandig opløsning,

skal der som værdi for startkoncentrationen anvendes den koncentration, som er målt i opløsningen (eller hvis dette ikke er teknisk muligt, målt i vandsøjlen) ved testens begyndelse. Koncentrationen bestemmes efter, at der er opnået ligevægt, men førend testorganismerne kommes i.

I alle disse tilfælde skal yderligere målinger foretages i løbet af testen for at sikre at koncentrationen har været opretholdt eller kvalitetskriterierne har været opfyldt.

pH må ikke variere med mere end 1 enhed.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. Reagenser

1.6.1.1. *Teststofopløsninger*

Der fremstilles stamopløsninger af den påkrævede styrke ved opløsning af stoffet i deioniseret vand eller vand som beskrevet i 1.6.1.2.

De valgte testkoncentrationer fremstilles ved fortynding af stamopløsningen. Hvis der testes høje koncentrationer, kan stoffet opløses direkte i det vand, der ellers anvendes til fortynding.

Stoffer testes normalt kun op til opløselighedsgrænsen. For visse stoffer (f.eks. stoffer, som er tungt opløselige i vand, som har en høj P_{ow}-værdi, eller som danner en stabil dispersion og ikke en ægte opløsning) kan det accepteres, at der anvendes en testkoncentration, der er større end opløseligheden, så det sikres, at den højeste opløste/stabile koncentration er nået. Det er dog vigtigt, at denne koncentration ikke på anden måde forstyrrer testsystemet (f.eks. dannelse af en hinde af stoffet på vandoverfladen, så vandet ikke iltes, osv.).

Der kan tages ultralyd, organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler til hjælp til fremstilling af stamopløsninger af stoffer, der er tungt opløselige i vand, og til dispergering af sådanne stoffer i testmediet. Hvis der anvendes hjælpestoffer, skal alle testkoncentrationer indeholde samme mængde hjælpestof, og der anvendes en ekstra kontrolgruppe, der udsættes for samme koncentration af hjælpestoffet, som der er anvendt i testserien. Sådanne hjælpestoffer anvendes i den lavest mulige koncentration, der i hvert tilfælde ikke må være større end 100 mg/l i testmediet.

Testen gennemføres uden justering af pH. Hvis der konstateres en væsentlig pH-ændring, anbefales det at gentage testen med justeret pH, og disse resultater rapporteres. I så fald justeres stamopløsningens pH til samme værdi som i det vand, der anvendes til fortynding, medmindre der er særlige grunde til at undlade dette. Til justering af pH foretrækkes HCl og NaOH. Justering af pH skal foregå på en sådan måde, at koncentrationen af teststof i stamopløsningen ikke ændres væsentligt. Hvis teststoffet reagerer kemisk eller udfældes ved justeringen, rapporteres dette.

1.6.1.2. *Testvand*

Til denne test anvendes der kunstigt fremstillet ferskvand (se tillæg 1 og reference (2): ISO 6341). For at overflødiggøre akklimatisering inden testen anbefales det, at det vand, der benyttes til opbevaring, er af samme kvalitet (med hensyn til pH og hårdhed) som det vand, der anvendes til testen.

1.6.2. **Apparatur**

Der anvendes sædvanligt laboratorieapparatur og -udstyr. Udstyr, der kommer i berøring med testopløsningerne, skal helst bestå udelukkende af glas:

— oxygenmåleudstyr (med mikroelektrode eller andet udstyr, der er egnet til måling af opløst oxygen i små prøver)

— passende apparatur til temperaturkontrol

— pH-meter

— udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed.

1.6.3. **Testorganisme**

Den foretrukne art er *Daphnia magna*, men *Daphnia pulex* kan også anvendes. Forsøgsdyrene skal være mindre end 24 timer gamle ved forsøgets begyndelse, opdrættet i laboratoriet og fri for åbenbare sygdomme, og deres forhistorie (f.eks. opdrætning og eventuel forbehandling) skal være kendt.

1.6.4. **Testens udførelse**

Forud for den endelige test kan der udføres en indledende test med det formål at skaffe oplysninger om, hvilke koncentrationer der skal anvendes i den endelige test.

Udover testserien medtages en kontrolgruppe uden teststof og i givet fald en kontrolgruppe med hjælpestof.

Dafnierne udsættes for stoffet som beskrevet nedenfor:

— *varighed*: helst 48 timer

— *antal dyr*: mindst 20 ved hver testkoncentration, helst opdelt i fire grupper med hver 5 dyr eller 2 grupper med hver 10 dyr

— *belastning*: mindst 2 ml testopløsning pr. dyr

— *testkoncentration*: testopløsningen fremstilles umiddelbart før dafnierne kommes i, helst uden anvendelse af andre opløsningsmidler end vand. Koncentrationerne udgør en kvotientrække med en kvotient på højst 2,2. Parallelt kontroller anvendes et passende antal koncentrationer, således at der opnås 0 og 100 % immobilisering efter 48 timer og forskellige grader af immobilisering, således at en 48 timers EC_{50} kan beregnes

— *vand*: se 1.6.1.2

— *lys*: anvendelse af en cyklus med skiftende lys og mørke er valgfri

— *temperatur*: testtemperaturen skal ligge mellem 18 og 22 °C, men inden for ± 1 °C i den enkelte test

— *beluftning*: testopløsningerne må ikke beluftes ved luftgennembobling

— *fodring*: ingen.

Ved forsøgets afslutning måles pH og oxygenkoncentrationen i kontrolgrupperne og ved alle testkoncentrationerne; testopløsningernes pH må ikke ændres.

Flygtige forbindelser testes i lukkede beholdere, der er helt fyldt op, og som er tilstrækkeligt store til, at der ikke opstår oxygenmangel.

Dafnierne inspiceres efter højst 24 timers eksponering og igen efter 48 timer.

Grænsetest

En grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om EC_{50} er større end denne koncentration kan anvendes, hvis den fremgangsmåde, som er anført i denne testmetode, benyttes.

Hvis stoffet er af en sådan art, at der ikke kan opnås en koncentration på 100 mg/l i testvandet, udføres grænsetesten ved stoffets mætningskoncentration (eller den højeste koncentration, ved hvilken der dannes en stabil dispersion) i det anvendte medium (se også 1.6.1.1).

Grænsetesten udføres med 20 dafnier, opdelt i to eller fire grupper, samt kontrolgrupper af samme størrelse. Hvis der sker immobilisering, må der gennemføres en komplet undersøgelse.

2. DATA OG EVALUERING

For hver af de perioder, hvor der er foretaget observationer (24 og 48 timer), afsættes den procentvise dødelighed mod koncentrationen på logaritmisk sandsynlighedspapir.

For hvert observationstidspunkt skønnes om muligt EC_{50} og konfidensgrænserne ($p = 0,05$) ved hjælp af standardprocedurer; disse værdier afrundes til ét, eller højst to betydende cifre (eksempler på afrunding til 2 cifre: 173,5 til 170; 0,127 til 0,13; 1,21 til 1,2).

I de tilfælde, hvor hældningen af koncentration/responsprocentkurven er for stejl til, at EC_{50} kan beregnes, er et skøn ud fra kurven tilstrækkeligt.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et indbyrdes forhold på 2,2 giver en immobilisering på 0 og 100 %, er disse to værdier tilstrækkelige til angivelse af, i hvilket interval EC_{50} ligger.

Hvis det bemærkes, at teststoffet ikke kan holdes stabilt eller homogent, skal dette anføres, og resultaterne må fortolkes med forsigtighed.

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— oplysninger om testorganismen (videnskabeligt navn, stamme, leverandør eller kilde, eventuel forbehandling, opdrætningsmetode - herunder kilde, fodertype og -mængde samt fodringshyppighed)

— hvor det vand, der er anvendt til fortynding, kommer fra og dets vigtigste kemiske egenskaber (pH, hårdhed og temperatur)

— for stoffer, der er tungtopløselige i vand, hvilken metode der er anvendt til fremstilling af stam- og testopløsning

— koncentrationen af eventuelle hjælpestoffer

— en liste over de anvendte koncentrationer og alle foreliggende oplysninger om testkemikaliets stabilitet i testopløsningen ved disse koncentrationer

— metoder og resultater, hvis der er udført kemiske analyser

— resultaterne af en eventuel grænsetest

— beskrivelse af testudstyret

— lysforhold

— koncentrationen af opløst oxygen, pH og temperatur i testopløsningerne

— godtgørelse af, at kvalitetskriterierne er opfyldt

— en tabel med den kumulative immobilisering for hver koncentration og for kontrolgruppen (samt i givet fald for kontrolgruppen med hjælpestof) på alle de anbefalede observationstidspunkter (24 og 48 timer)

— afbildning af koncentration/responsprocent-kurven ved testens afslutning

— om muligt EC_{50}-værdier på alle de anbefalede observationstidspunkter (med 95 % konfidensgrænser)

— hvilke statistiske metoder der er anvendt til bestemmelse af EC_{50}

— hvis der er benyttet et referencestof, de fundne resultater

— højeste testkoncentration, der ikke forårsager nogen immobilisering inden for testperioden

— laveste testkoncentration, der forårsager 100 % immobilisering inden for testperioden.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) International Standard ISO, Water Quality — Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989.

(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera — crustacea) NFT 90 301 (January 1983).

(4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

(6) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(7) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99-113.

(8) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(9) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(10) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer AND J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(11) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

Tillæg 1

Kunstigt fremstillet ferskvand

Eksempel på vand egnet til fortynding (ifølge ISO 6341)

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Vandet skal være destilleret vand af god kvalitet eller deioniseret vand med en ledningsevne på mindre end 5 μScm^{-1}.

Vanddestillationsapparater må ikke indeholde dele af kobber.

Stamopløsninger

$CaCl_2 \cdot H_2O$ (calciumchlorid dihydrat): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	11,76 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	4,93 g
$NaHCO_3$ (natriumhydrogencarbonat): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	2,59 g
KCl (kaliumchlorid): opløses i vand og fortyndes til 1 liter	0,23 g

Kunstigt fremstillet ferskvand til fortynding

25 ml af hver af de fire stamopløsninger blandes, og der fortyndes til 1 liter med vand.

Opløsningen beluftes, indtil koncentrationen af opløst oxygen svarer til værdien ved mætning.

pH skal være 7,8 ± 0,2.

Om nødvendigt justeres pH med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyre).

Det således fremstillede vand til fortynding henstår i ca. 12 timer og beluftes ikke yderligere.

Summen af Ca- og Mg-ioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l. Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1 og mellem Na- og K-ioner 10:1. Opløsningens totale basestyrke er 0,8 mmol/l.

Afvigelser ved fremstillingen af fortyndingsvandet må ikke medføre ændringer i andets sammensætning og egenskaber.

Tillæg 2

Sammenfatning af resultaterne af en EF-ringtest gennemført i 1978 (også citeret i reference 2)

Anmærkning: denne ringtest havde til formål at bestemme *24 timers* EC_{50}.

Anvendte stoffer:

1) kaliumdichromat

2) tetrapropylbenzensulfonsyre

3) natriumtetrapropylbenzensulfonat

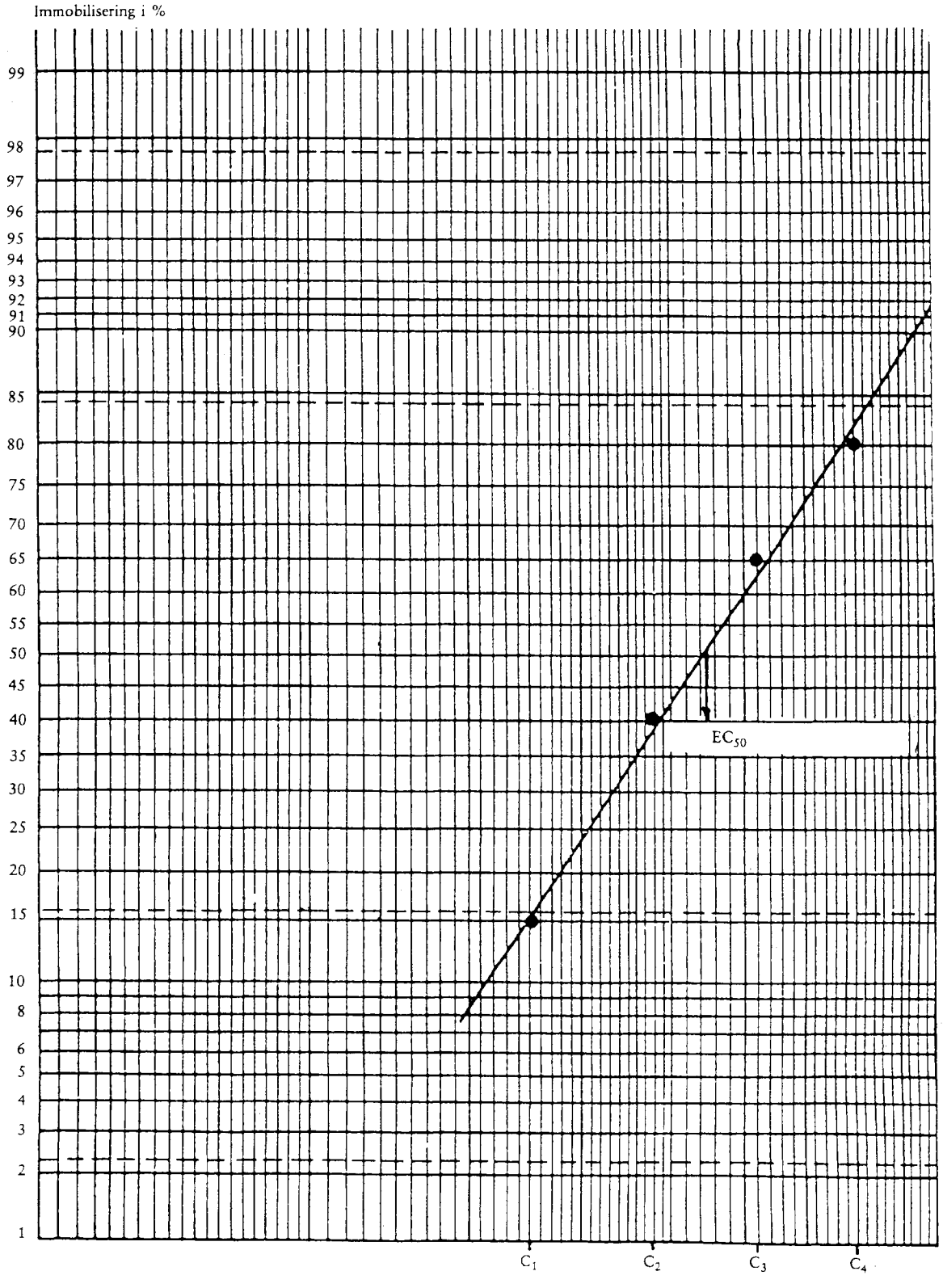
4) kaliumtrichlor-2,4,5-phenoxyacetat

Stof	Antal deltagende laboratorier	Antal resultater til beregning	EC_{50}-24 h mg/l gennemsnit
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Tillæg 3

Eksempel på kurve over koncentration mod immobiliseringsprocent

Eksempel på bestemmelse af EC_{50} på log/sandsynlighedspapir



C.3. VÆKSTHÆMNINGSTEST FOR ALGER

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne test er at bestemme et stofs virkning på væksten af en encellet grønalgeart. Med relativt korte tests (72 timer) kan virkningerne vurderes over flere generationer. Da metoden kan tilpasses til brug med adskillige encellede algearter, må forsøgsrapporten indeholde en beskrivelse af den metode, der er anvendt.

Metoden er lettest at anvende for vandopløselige stoffer, som under forsøsbetingelserne kan forventes at forblive i vandet.

Metoden kan benyttes til stoffer, der ikke direkte interfererer med måling af algevækst.

Det er ønskeligt at have flest mulige oplysninger om teststoffets vandopløselighed, damptryk, kemiske stabilitet, dissociationskonstanter og bionedbrydelighed, førend testen påbegyndes.

Øvrige oplysninger (f.eks. strukturformel, renhedsgrad, art og procentdel af betydende urenheder, tilstedeværelse og mængde af tilsætningsstoffer, samt n-octanol/vand-fordelingskoefficienten) bør tages i betragtning både ved planlægningen af testen og ved fortolkningen af dens resultater.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Celletæthed: antal celler pr. milliliter.

Vækst: forøgelsen i celletætheden i testperioden.

Væksthastighed: forøgelsen i celletætheden pr. tidsenhed.

EC_{50}: i denne metode den koncentration af teststoffet, der medfører, at enten væksten (E_bC_{50}) eller væksthastigheden (E_rC_{50}) nedsættes med 50 % i forhold til kontrolkulturen.

NOEC (no observed effect concentration): i denne metode den højeste koncentration, hvor der ikke iagttages nogen signifikant væksthæmning i forhold til kontrolkulturen.

Alle koncentrationer af teststoffet er angivet i vægt pr. volumenenhed (mg/l). De kan også udtrykkes i vægtforhold (mg/kg).

1.3. REFERENCESTOFFER

Der kan anvendes et referencestof til at godtgøre, at forsøgsorganismernes følsomhed ikke har ændret sig væsentligt under forsøgsbetingelserne i laboratoriet.

Hvis der benyttes et referencestof, skal resultaterne anføres i forsøgsrapporten. Kaliumdichromat kan anvendes som referencestof, men dets farve kan indvirke dels på kvaliteten og styrken af det lys, som cellerne har til rådighed, dels på en eventuel spektrofotometrisk bestemmelse. Der blev benyttet kaliumdichromat i en international ringtest (se ref. (3) og tillæg 2).

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Der kan udføres en grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om EC_{50} er større end denne koncentration.

Kulturer af en udvalgt grønalge i den eksponentielle vækstfase udsættes for forskellige koncentrationer af teststoffet gennem flere generationer under veldefinerede forhold.

Testopløsningerne inkuberes i 72 timer, og i denne periode måles celletætheden mindst hver 24. time. Væksthæmningen i forhold til en kontrolkultur bestemmes.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierne gælder for såvel grænsetesten som den komplette testmetode.

Celletætheden i kontrolkulturerne skal være vokset med en faktor på mindst 16 i løbet af 3 dage.

Koncentrationen af teststoffet skal ligge over 80 % af startkoncentrationen i et tidsrum, der svarer til testens varighed.

For stoffer, der let opløses i testmediet og giver stabile opløsninger, dvs. stoffer, der ikke i væsentlig grad fordamper, nedbrydes, hydrolyseres eller adsorberes, kan startkoncentrationen antages at være lig med den nominelle koncentration. Det skal godtgøres, at koncentrationen har været opretholdt gennem hele testen, og at kvalitetskriterierne er opfyldt.

For stoffer, som

(i) er tungt opløselige i testmediet eller

(ii) kan danne stabile emulsioner eller dispersioner eller

(iii) er ustabile i vandig opløsning,

skal der som værdi for startkoncentrationen anvendes den koncentration, som er målt ved testens begyndelse. Koncentrationen bestemmes efter, at der opnået ligevægt.

I alle disse tilfælde skal yderligere målinger foretages i løbet af testen for at sikre at koncentrationen har været opretholdt eller kvalitetskriterierne har været opfyldt.

Det er velkendt, at en væsentlig mængde teststof vil være indeholdt i algebiomassen ved testens afslutning. Derfor burde både den del af teststoffet, der er indeholdt i biomassen, og den del, der er i opløsning (eller hvis det ikke er teknisk muligt, målt i vandsøjlen), tages i betragtning ved godtgørelse af, at ovennævnte kvalitetskriterier er opfyldt. Da det kan volde betydelige tekniske problemer at bestemme teststofkoncentrationen i algebiomassen, kan opfyldelse af kvalitetskriterierne godtgøres ved, at der anvendes en testbeholder med den højeste stofkoncentration men uden alger, hvori koncentrationen i opløsningen (eller hvis det ikke er teknisk muligt, i vandsøjlen) måles ved testperiodens begyndelse og slutning.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Reagenser**

1.6.1.1. *Teststofopløsninger*

Der fremstilles stamopløsninger af den påkrævede styrke ved opløsning af stoffet i deioniseret vand eller vand som beskrevet i 1.6.1.2.

De valgte testkoncentrationer fremstilles ved tilsætning af passende teststofmængder til algeforkulturer (se tillæg 1). Stoffer testes normalt kun op til opløselighedsgrænsen. For visse stoffer (f.eks. stoffer, som er tungt opløselige i vand, som har en høj P_{ow}-værdi, eller som danner en stabil dispersion og ikke en ægte opløsning) kan det accepteres, at der anvendes en testkoncentration, der er større end opløseligheden, så det sikres, at den højeste opløste/stabile koncentration er nået. Det er dog vigtigt, at denne koncentration ikke på anden måde forstyrrer testsystemet (f.eks. dannelse af en hinde af stoffet på vandoverfladen, så vandet ikke iltes, osv.).

Der kan tages ultralyd, organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler til hjælp til fremstilling af stamopløsninger af stoffer, der er tungt opløselige i vand, og til dispergering af sådanne stoffer i testmediet. Hvis der anvendes hjælpestoffer, skal alle testkoncentrationer indeholde samme mængde hjælpestof, og der anvendes en ekstra kontrolkultur, der udsættes for samme koncentration af hjælpestoffet, som der er anvendt i testserien. Sådanne hjælpestoffer anvendes i den lavest mulige koncentration, der i hvert tilfælde ikke må være større end 100 mg/l i testmediet.

Testen gennemføres uden justering af pH. Hvis der konstateres en væsentlig pH-ændring, anbefales det at gentage testen med justeret pH, og disse resultater rapporteres. I så fald justeres stamopløsningens pH til samme værdi som i det vand, der anvendes til fortynding, medmindre der er særlige grunde til at undlade dette. Til justering af pH foretrækkes HCl og NaOH. Justering af pH skal foregå på en sådan måde, at koncentrationen af teststof i stamopløsningen ikke ændres væsentligt. Hvis teststoffet reagerer kemisk eller udfældes ved justeringen, rapporteres dette.

1.6.1.2. *Testmedium*

Vandet skal være destilleret vand af god kvalitet eller deioniseret vand med en ledningsevne på mindre end 5 μScm^{-1}. Vanddestillationsapparater må ikke indeholde dele af kobber.

Følgende medium anbefales.

Der fremstilles fire stamopløsninger ifølge nedenstående tabel. Stamopløsningerne steriliseres ved autoklavering eller membranfiltrering, hvorefter de opbevares ved 4 °C beskyttet mod lys. Stamopløsning nr. 4 må kun steriliseres ved membranfiltrering. Testopløsningernes endelige næringsstofkoncentration opnås ved fortynding af stamopløsningerne.

Næringsstof	Koncentration i stamopløsning		Slutkoncentration i testopløsning	
Stamopløsning 1: hovednæringsstoffer				
NH_4Cl	1,5	g/l	15	mg/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2	g/l	12	mg/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8	g/l	18	mg/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5	g/l	15	mg/l
KH_2PO_4	0,16	g/l	1,6	mg/l
Stampoløsning 2: Fe-EDTA				
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	80	mg/l	0,08	mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100	mg/l	1	mg/l
Stamopløsning 3: sporstoffer				
H_3BO_3	185	mg/l	0,185	mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415	mg/l	0,415	mg/l
$ZnCl_2$	3	mg/l	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5	mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01	mg/l	10^{-5}	mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7	mg/l	7×10^{-3}	mg/l
Stamopløsning 4: $NaHCO_3$				
$NaHCO_3$	50	g/l	50	mg/l

Når mediet er kommet i ligevægt med luft, er dets pH ca. 8.

1.6.2. **Apparatur**

— Sædvanligt laboratorieudstyr.

— Testkolber af passende volumen (f.eks. er 250 ml konisk kolbe passende til et testopløsningsvolumen på 100 ml). Alle testkolber skal være identiske, både med hensyn til materiale og dimensioner.

— Dyrkningsapparatur: kammer, hvori en temperatur mellem 21 og 25 °C kan holdes inden for ± 2 °C, og som har kontinuerlig ensartet belysning i området 400-700 nm. Vækstbetingelserne, herunder lysstyrken, anses for at have været tilfredsstillende, hvis kontrolkulturerne når op på den anbefalede vækshastighed.

Det anbefales at anvende en lysintensitet, som er på 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ($35\text{-}70 \cdot 10^{18}$ fotoner $m^{-2} \cdot s^{-1}$), når den måles i området 400-700 nm med en egnet modtager. For lysmåleudstyr, der er kalibreret i lux, er det tilsvarende passende niveau på 6 000-10 000 lux.

Denne lysintensitet kan opnås ved hjælp af 4-7 lysstofrør à 30 W af hvid standardtype (farvetemperatur ca. 4 000 K) anbragt i en afstand af 35 cm fra algekulturen.

— Målinger af celletætheden foretages ved direkte tælling af levende celler, f.eks. ved hjælp af et mikroskop med tællekammer. Andre metoder (fotometri, turbidimetri m.fl.) kan dog benyttes, hvis de er tilstrækkelig følsomme og det påvises, at de korrelerer tilstrækkelig godt med celletætheden.

1.6.3. **Testorganismer**

Det foreslås, at der anvendes en hurtigtvoksende grønalgeart, der er egnet til dyrkning og test. Følgende arter foretrækkes:

— *Selenastrum capricornutum*, f.eks. ATCC 22662 eller CCAP 278/4

— *Scenedesmus subspicatus*, f.eks. 86.81 SAG.

Bemærk:

ATCC = American Type Culture Collection (USA)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (UK)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, Tyskland)

Ved anvendelse af andre arter skal den benyttede stamme anføres i rapporten.

1.6.4. **Testens udførelse**

Ved hjælp af indledende tests bestemmes det koncentrationsområde, hvor der kan forventes at indtræde virkninger.

De to mål for væksten (biomasse og vækshastighed) kan føre til vidt forskellige resultater for vækshæmning; de skal begge anvendes i de indledende tests, så det sikres, at både E_bC_{50} og E_rC_{50} kan skønnes ud fra den kvotientrække, der vælges for koncentrationerne.

Celletætheden ved forsøgets begyndelse

Den anbefalede celletæthed i prøvekulturerne ved forsøgets begyndelse er ca. 10_4 celler/ml for *Selenastrum capricornutum* og *Scenedesmus subspicatus*. Ved anvendelse af andre arter skal biomassen være af samme størrelsesorden.

Koncentrationer af teststoffet

Til forsøget anvendes der mindst 5 koncentrationer, der danner en kvotientrække med en kvotient på højst 2,2. Den laveste koncentration må ikke have nogen synlig virkning på algernes vækst. Den højeste koncentration skal hæmme væksten med mindst 50 % i forhold til kontrolkulturen og helst standse væksten helt.

Gentagelser og kontrolkulturer

Forsøgsplanen skal omfatte tredobbelt bestemmelse ved hver koncentration. Der medtages desuden 3 kontrolkulturer uden teststof og i givet fald 3 kontrolkulturer med hjælpestof. Hvis det er begrundet, kan forsøgsplanen ændres ved, at antallet af koncentrationer øges og antallet af bestemmelser pr. koncentration nedsættes.

Udførelse af testen

Der fremstilles testkulturer med den ønskede teststofkoncentration og den ønskede mængde algeinoculum ved tilsætning af stamopløsning af teststoffet til en passende mængde algeforkultur (se tillæg 1).

Testkolberne rystes og anbringes i dyrkningsapparaturet. Algecellerne holdes i suspension ved rystning, omrøring eller gennembobling med luft, således at der bliver bedre luftudveksling og mindre pH-variationer i testopløsningerne. Kulturerne holdes ved en temperatur mellem 21 og 25 °C, der holdes konstant inden for ± 2 °C.

Celletætheden i hver kolbe bestemmes mindst 3 gange, nemlig 24, 48 og 72 timer efter forsøgets begyndelse. Når celletætheden måles på anden måde end ved direkte tælling, anvendes der filtreret algemedium med den pågældende teststofkoncentration til bestemmelse af baggrundsværdien.

pH måles ved forsøgets begyndelse og efter 72 timer.

Kontrolkulturernes pH må normalt ikke afvige med mere end 1,5 i løbet af forsøget.

Test af flygtige stoffer

Der findes i dag ingen generelt accepteret metode til test af flygtige stoffer. Hvis et stof vides at have tendens til at fordampe, kan der benyttes lukkede testkolber med ekstra luftrum over væsken. Muligheden for CO_2-mangel skal tages i betragtning, når dette ekstra luftrum beregnes. Der er foreslået varianter af denne metode (se reference 4).

Den mængde stof, der forbliver i opløsning, skal forsøges bestemt, og det tilrådes, at der udvises den største forsigtighed ved fortolkning af resultater af tests, der er udført med flygtige kemikalier i lukkede kolber.

Grænsetest

Der kan under anvendelse af den i denne test anførte fremgangsmåde udføres en grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om EC_{50} er større end denne koncentration.

Hvis stoffet er af en sådan art, at der ikke kan opnås en koncentration på 100 mg/l i testvandet, udføres grænsetesten ved stoffets mætningskoncentration (eller den højeste koncentration, ved hvilken der dannes en stabil dispersion) i det anvendte medium (se også 1.6.1.1).

Grænsetesten udføres mindst som en tredobbeltbestemmelse og med kontrolkulturer af samme størrelse. Begge mål for væksten (biomasse og vækshastighed) benyttes i grænsetesten.

Hvis biomassen eller vækshastigheden er mindst 25 % lavere i grænsetesten end i kontrolkulturen, må der gennemføres en komplet undersøgelse.

2. DATA OG EVALUERING

De celletætheder, der er målt i test- og kontrolkulturerne, opstilles i en tabel sammen med teststoffets koncentrationer og måletidspunkterne. Der optegnes vækstkurver for hver teststofkoncentration og for kontrolkulturerne ved afsætning af den gennemsnitlige celletæthed mod tiden (0-72 timer).

De to nedenstående metoder kan benyttes til bestemmelse af sammenhængen mellem koncentration og virkning. Nogle stoffer kan virke vækstfremmende ved lave koncentrationer. Kun datapunkter, hvor hæmningen er mellem 0 og 100 %, tages i betragtning.

2.1. SAMMENLIGNING AF AREALER UNDER VÆKSTKURVERNE

Arealet mellem vækstkurverne og den vandrette linje $N = N_0$ kan beregnes ved følgende formel:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

hvor

A = arealet

N_0 = antallet af celler pr. ml på tidspunktet t_0 (testens begyndelse)

N_1 = antallet af celler pr. ml på tidspunktet t_1

N_n = antallet af celler pr. ml på tidspunktet t_n

t_1 = tidspunktet for første måling efter testens begyndelse

t_n = tidspunktet for n'te måling efter testens begyndelse

n = det antal målinger, der er foretaget efter testens begyndelse.

Den procentvise hæmning af cellevæksten beregnes ved hver teststofkoncentration (I_A) efter følgende formel:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

hvor

A_c = arealet mellem den vandrette linje $N = N_0$ og vækstkurven for kontrolkulturen

A_t = arealet mellem den vandrette linje $N = N_0$ og vækstkurven ved koncentrationen t.

I_A-værdierne afsættes på semilogaritmisk papir eller semilogaritmisk sandsynlighedspapir mod de tilsvarende koncentrationer. Benyttes der sandsynlighedspapir, indtegnes den bedste rette linje, enten på øjemål eller ved regressionsberegning.

Ud fra regressionslinjen skønnes EC_{50} ved aflæsning af den koncentration, der svarer til 50 % inhibering (I_A = 50 %). Som utvetydig betegnelse for den værdi, der er fundet ved denne beregningsmetode, foreslås det at benytte E_bC_{50}. Det er vigtigt, at den pågældende eksponeringstid anføres sammen med E_bC_{50}, f.eks. E_bC_{50}(0-72 h).

2.2. SAMMENLIGNING AF VÆKSTRATER (SPECIFIKKE VÆKSTHASTIGHEDER)

Den gennemsnitlige specifikke vækshastighed ($I_{\mu r}$, den gennemsnitlige vækstrate) for kulturer i den eksponentielle vækstfase kan beregnes ved

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

hvor t_0 er tidspunktet for forsøgets begyndelse.

Alternativt kan den gennemsnitlige specifikke vækshastighed afledes af hældningen af regressionslinjen i en afbildning af ln N mod tiden.

Den procentvise hæmning af den gennemsnittige specifikke vækshastighed beregnes for hver teststofkoncentration ($I_{\mu t}$) ved hjælp af følgende formel:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

hvor

μ_c = kontrolkulturens gennemsnitlige specifikke vækshastighed (= gennemsnitlige vækstrate)

μ_t = den gennemsnitlige specifikke vækshastighed ved testkoncentrationen t.

Den procentvise nedsættelse i den gennemsnitlige specifikke væksthastighed ved hver teststofkoncentration i forhold til kontrolværdien afbildes mod logaritmen til koncentrationen. EC_{50} kan aflæses af den fremkomne kurve. Som utvetydig betegnelse for den EC_{50}-værdi, der er fundet ved denne beregningsmetode, foreslås det at benytte E_rC_{50}. Måletidspunkterne skal anføres, dvs. at betegnelsen bliver f.eks. E_rC_{50}(0-72 h), hvis værdierne vedrører tidspunkterne 0 og 72 timer.

Bemærk: Specifik væksthastighed er et logaritmisk udtryk, og små ændringer i vækstraten (= den specifikke væksthastighed) kan medføre store ændringer i biomassen. Man kan derfor ikke sammenligne talværdierne for E_bC og E_rC direkte.

2.3. BEREGNING AF NOEC-VÆRDIEN

Den koncentration, hvor der ikke kan iagttages nogen virkning, (NOEC-værdien) bestemmes ved hjælp af en egnet statistisk metode til sammenligning af flere prøver (f.eks. variansanalyse eller Dunnett's test), som anvendes på de enkelte værdier af arealerne under vækstkurverne A (se 2.1) eller af de specifikke væksthastigheder μ (se 2.2).

3. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

- teststof: kemisk betegnelse
- testorganismer: oprindelse, laboratoriekultur, stammenummer og dyrkningsmetode
- testbetingelser:
  - testens begyndelses— og sluttidspunkt og dens varighed
  - temperatur
  - mediets sammensætning
  - dyrkningsapparatur
  - opløsningernes pH ved testens begyndelse og afslutning (der redegøres for eventuelt iagttagne afvigelser på mere end 1,5)
  - hvilket vehikel og hvilken metode der er anvendt til opløsning af teststoffet, samt vehiklens koncentration i testopløsningerne
  - lysintensitet og -kvalitet
  - testkoncentrationer (målte eller nominelle)
- resultater:
  - celletæthed i hver kolbe ved hvert målepunkt, samt hvilken metode der er anvendt til måling af celletætheden
  - gennemsnitlige celletætheder
  - vækstkurver
  - grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og effekt
  - EC-værdier og beregningsmetode
  - NOEC
  - andre iagttagne effekter.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag »Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*«, in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

(3) ISO 8692 — Water Quality — Fresh water algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum.

(4) S.Galassi and M.Vighi — Chemosphere, 1981, vol. 10, 1 123-1 126.

Tillæg 1

Eksempel på fremgangsmåde ved dyrkning af alger

Almindelige bemærkninger

Formålet med dyrkning efter følgende fremgangsmåde er at fremskaffe algekulturer til toksicitetstest.

Der træffes foranstaltninger til at sikre, at algekulturerne ikke inficeres med bakterier (ISO 4833). Det er ønskeligt at have axeniske kulturer, men det er absolut nødvendigt at kulturerne kun består af én algeart.

Alle operationer foretages under sterile forhold, så kontaminering med bakterier og andre alger undgås. Kontaminerede kulturer kasseres.

Fremgangsmåde til fremskaffelse af algekulturer

Fremstilling af næringsopløsninger (substrater)

Substratet kan fremstilles ved fortynding af koncentrerede næringsstofopløsninger. Til faste substrater tilsættes 0,8 % agar. Der anvendes kun sterile substrater. Ved autoklavering kan der ske tab af NH_3.

Stamkultur

Stamkulturerne er små algekulturer, som regelmæssigt overføres til frisk substrat, og som benyttes som udgangsmateriale til testen. Hvis disse kulturer ikke anvendes regelmæssigt, spredes de ud på skrå agarrør. Sådanne kulturer overføres til frisk substrat mindst hver anden måned.

Stamkulturerne dyrkes i koniske kolber med et egnet substrat (volumen ca. 100 ml). Dyrkes algerne ved 20 °C med kontinuerlig belysning, er overførsel én gang ugentligt påkrævet.

Ved overførslen overføres en mængde af den »gamle« kultur med en steril pipette til en kolbe med frisk substrat, så der med de hurtigtvoksende arter er en startkoncentration på ca. 1/100 af koncentrationen i den gamle kultur.

En arts væksthastighed kan bestemmes ud fra vækstkurven. Hvis denne kendes, kan man skønne, ved hvilken tæthed kulturen må overføres til et nyt substrat. Dette skal gøres før kulturen når dødsfasen.

Forkultur

Forkulturen har til formål at give en passende algemængde til podning af testkulturerne. Forkulturer inkuberes under forsøgsbetingelserne og tages i anvendelse, medens væksten stadig er eksponentiel, normalt efter ca. 3 dage. Algekulturer, der indeholder deforme eller abnorme celler, kasseres.

Tillæg 2

I ISO 8692 — Water Quality — Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum* er nedenstående resultater af en sammenlignende laboratorietest med kaliumdichromat udført på 16 laboratorier anført

	Gennemsnit (mg/l)	Interval (mg/l)
E_rC_{50} (0-72 h)	0,84	0,60-1,03
E_bC_{50} (0-72 h)	0,53	0,20-0,75

C.4. BESTEMMELSE AF »LET« BIONEDBRYDELIGHED

DEL I. GENERELLE BETRAGTNINGER

I.1. INDLEDNING

Der er beskrevet 6 metoder til screening af kemikalier for let bionedbrydelighed i aerobt vandigt miljø:

(a) Eliminering af opløst organisk kulstof (DOC) (metode C.4-A)

(b) Modificeret OECD-screeningtest — eliminering af DOC (metode C.4-B)

(c) Kuldioxidudvikling (modificeret Sturm-test) (metode C.4-C)

(d) Manometrisk respirometri (metode C.4-D)

(e) Closed Bottle Test (metode C.4-E)

(f) MITI-test (Ministry of International Trade and Industry — Japan) (metode C.4-F)

Del I indeholder generelle betragtninger og betragtninger, der gælder for alle seks test. I del II-VII findes de punkter, der er specifikke for de enkelte test. Tillæggene indeholder definitioner, formler og vejledende oplysninger.

I 1988 gennemførte OECD en ringtest, som viste, at metoderne giver indbyrdes overensstemmende resultater. Imidlertid kan en bestemt metode foretrækkes, alt efter det undersøgte stofs fysiske egenskaber.

I.2. VALG AF METODE

For at kunne vælge den bedst egnede metode er det afgørende at have kendskab til kemikaliets opløselighed, damptryk og adsorptionsegenskaber. Den kemiske struktur eller formel bør kendes for at kunne beregne den teoretiske værdi og/eller kontrollere målte værdier af parametre som f.eks. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC og COD (se bilag I og II).

Testkemikalier, der er opløselige i vand med mindst 100 mg/l og ikke-flygtige og ikke-adsorberende, kan vurderes ved alle metoderne. Af tabel 1 fremgår, hvilke metoder der er egnede for kemikalier, der er tungtopløselige i vand, flygtige eller adsorberende. I bilag III er det beskrevet, hvordan man kan bære sig ad med tungt vandopløselige og flygtige kemikalier. Kemiske stoffer med moderat flygtighed kan testes i DOC-henfaldsmetoden, hvis der er tilstrækkelig luftrum i testbeholderen (som skal tillukkes passende). I dette tilfælde, skal der benyttes en abiotisk kontrolkolbe, som tillader ethvert fysisk tab.

Tabel 1: Testmetodernes anvendelsesområder

Test	Analysemetode	Egnet til stoffer, der er:		
		tungt opløselige	flygtige	adsorberende
DOC-eliminering	Opløst organisk kulstof	–	–	±
Mod. OECD DOC-elim.	Opløst organisk kulstof	–	–	±
CO_2-udvikling	Respirometri: CO_2-udvikling	+	–	+
Manometrisk respirometri	Manometrisk respirometri: oxygenforbrug	+	±	+
Closed Bottle	Respirometri: opløst oxygen	±	+	+
MITI	Respirometri: oxygenforbrug	+	±	+

Oplysninger om testmaterialets renhed eller forholdet mellem dets hovedbestanddele er nødvendige for fortolkning af de fundne resultater, især hvis de er små eller usikre.

Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for bakterier (bilag IV) kan være til nytte ved valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

I.3. REFERENCESTOFFER

Til kontrol af fremgangsmåden benyttes der referencestoffer, som opfylder kriterierne for let bionedbrydelighed, og som testes i en separat kolbe parallelt med de øvrige prøver.

Anilin (frisk destilleret), natriumacetat og natriumbenzoat er egnede kemikalier. Alle disse referencekemikalier nedbrydes ved disse metoder, selv når der ikke tilsættes inoculum.

Det har været fremført, at man burde finde frem til et referencekemikalie, der er let nedbrydeligt men kræver tilsætning af inoculum, selv i Closed Bottle-metoden. Kaliumhydrogenphthalat har været foreslået, men der mangler endnu konkret bevis med dette stof, før det kan accepteres som et referencestof.

I metoder, der er baseret på respirometri, kan nitrogenholdige forbindelser påvirke oxygenoptagelsen på grund af nitrifikation (se bilag II og V).

I.4. TESTMETODERNES PRINCIP

Teststoffet opløses eller opslæmmes i et uorganisk medium, inoculeres og inkuberes under aerobe forhold i mørke eller dæmpet lys. Den del af DOC i opløsningen, der stammer fra inoculum, skal være så lavt som muligt lille i forhold til den del, der stammer fra teststoffet. Der tages hensyn til inoculums endogene aktivitet ved at køre parallelle blindprøver med inoculum men uden teststof i opløsningen, selvom cellernes endogene aktivitet under tilstedeværelse af stoffet ikke præcis svarer til denne i den endogene kontrol. Et referencestof benyttes parallelt for at kontrollere hvorledes procedurerne fungerer.

I regelen følges nedbrydningen ved bestemmelse af parametre såsom DOC, CO_2-dannelse og oxygenoptagelse, og der foretages målinger med tilstrækkeligt hyppige intervaller således at begyndelsen og afslutningen af bionedbrydningen kan identificeres. Med automatiske respirometre sker målingen kontinuerligt. Undertiden måles både DOC og en anden parameter, men det er normalt kun tilfældet ved testens begyndelse og slutning. Der kan også anvendes specifik kemisk analyse til bedømmelse af den primære nedbrydning af teststoffet og til bestemmelse af koncentrationen af eventuelle mellemprodukter (obligatorisk i MITI-testen).

Normalt løber testen over 28 dage. Når bionedbrydningskurven har nået et plateau ved mindst 3 målinger, kan testen dog afbrydes. Hvis kurven viser, at bionedbrydningen er begyndt men ikke har nået et plateau inden de 28 dage, kan testen forlænges ud over denne periode.

I.5. KVALITETSKRITERIER

I.5.1. **Reproducerbarhed**

Som følge af bionedbrydningens natur og den blandede bakteriepopulation i inoculum, foretages der mindst dobbeltbestemmelse.

Den almindelige erfaring er, at variationen mellem gentagelser bliver mindre, desto større startkoncentrationen af mikroorganismer i testmediet er. Ringtest har desuden vist, at der kan være betydelige forskelle mellem de resultater, forskellige laboratorier når frem til, men der opnås generelt god overensstemmelse med let bionedbrydelige forbindelser.

I.5.2. **Testens gyldighed**

En test anses for gyldig, hvis forskellene mellem de to yderste værdier for teststoffets forsvinden ved en multibestemmelse i plateau-fasen, ved afslutningen af testen eller ved afslutningen af 10 døgns-vinduet er mindre end 20 %, og hvis den procentvise nedbrydning af referencestoffet har nået niveauet for let bionedbrydelighed inden for 14 dage. Hvis ikke begge betingelser er opfyldt, gentages testen. Da metoderne er ret strikse, betyder lave værdier ikke nødvendigvis, at stoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøforhold, men at der kræves yderligere arbejde til bestemmelse af bionedbrydeligheden.

Er nedbrydningen i en toksicitetstest med både teststof og referencekemikalie mindre end 35 % (baseret på DOC) eller 25 % (baseret på ThOD eller $ThCO_2$) på 14 dage, må testkemikaliet antages at være hæmmende (se også bilag IV). Testrækken gentages, om muligt med lavere teststofkoncentration og/eller højere inoculumkoncentration, dog højst 30 mg tørstof pr. liter.

I.6. GENERELLE PROCEDURER

De generelle betingelser for testene er sammenfattet i tabel 2. Apparatur og forsøgsomstændigheder, der er specifikke for en bestemt test, er beskrevet senere under den pågældende test.

Tabel 2: Testbetingelser

Test	DOC-eliminering	CO_2-udvikling	Manometrisk respirometri	Modificeret OECD-screening	Closed Bottle	MITI(I)
Teststofkoncentration i mg/l mg DOC/l mg ThOD/l	10-40	10-20	100 50-100	10-40	2-10 5-10	100
Inoculumkoncentration (omtrentligt antal celler pr. liter)	≤ 30 mg/l TS eller ≤ 100 ml spildevand pr. l ($10^7 - 10^8$)			0,5 ml sekundært spildevand pr. l (10^5)	≤ 5 ml spildevand pr. l ($10^4 - 10^6$)	30 mg/l TS ($10^7 - 10^8$)
Grundstofkoncentration i uorganisk medium (i mg/l) P N Na K Mg Ca Fe	116 1,3 86 122 2,2 9,9 0,05-0,1				11,6 0,13 8,6 12,2 2,2 9,9 0,05-0,1	29 1,3 17,2 36,5 6,6 29,7 0,15
pH	7,4 ± 0,2					helst 7,0
Temperatur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = opløst organisk kulstof ThOD = teoretisk oxygenforbrug TS = tørstof i suspension

I.6.1. **Vand**

Det deioniserede eller destillerede vand, der benyttes, må hverken indeholde toksiske stoffer (f.eks. Cu^{++}-ioner) i hæmmende mængder eller organisk kulstof svarende til mere end 10 % af testmaterialets organiske kulstof. Denne høje renhed er nødvendig for at undgå høje blindværdier. Forureninger kan stamme fra naturlige urenheder og fra ionbytterharpikser og lyseret materiale fra bakterier og alger. Til hver testserie anvendes kun én bestemt batch af vand, som i forvejen er kontrolleret ved DOC-analyse. En sådan kontrol er ikke nødvendig for Closed Bottle-testen, men oxygenforbruget fra vandet skal være lavt.

I.6.2. **Stamopløsninger af uorganiske medium**

Der fremstilles stamopløsninger af uorganiske medier med passende koncentrationer af salte til brug ved fremstilling af testopløsningerne. Følgende stamopløsninger kan (med forskellige fortyndingsforhold) anvendes til DOC-eliminering, modificeret OECD-screening, CO_2-udvikling, manometrisk respirometri og Closed Bottle-test.

Fortyndingsforholdene og for MITI-testens vedkommende fremstilling af det specifikke uorganiske medium, er anført under de enkelte metoder.

Stamopløsninger:

Følgende stamopløsninger fremstilles ud fra reagenser af analysekvalitet:

(a)	monokaliumdihydrogenorthophosphat, KH_2PO_4	8,50 g
	dikaliummonohydrogenorthophosphat, K_2HPO_4	21,75 g
	dinatriummonohydrogenorthophosphat dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,40 g
	ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
	Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Opløsningens pH skal være 7,4.	
(b)	calciumchlorid, vandfrit, $CaCl_2$	27,50 g
	eller calciumchlorid dihydrat, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36,40 g
	Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.	
(c)	magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.	
(d)	jern(III)chlorid hexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.	

Anmærkning: For at undgå at skulle fremstille denne opløsning umiddelbart før brugen tilsættes der 1 dråbe koncentreret HCl eller 0,40 g ethylendiamintetraeddikesyre dinatriumsalt (EDTA) pr. liter.

I.6.3. **Stamopløsninger af kemikalier**

Hvis opløseligheden er større end 1 g/l opløses f.eks. 1-10 g af test- eller referencekemikalie i deioniseret vand, og der fortyndes til 1 liter. I modsat fald fremstilles stamopløsningen i det uorganiske medium, eller kemikaliet tilsættes direkte til det uorganiske medium. Jf. tillæg III for håndtering af mindre opløselige kemikalier; dog må der i MITI-testen (metode C.4-F) hverken anvendes opløsningsmidler eller emulgatorer.

I.6.4. **Inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder, f.eks. aktivt slam, spildevandsafløb (ikke chloreret), overfladevand og -jord eller en blanding af disse. Aktivt slam til DOC-eliminering, CO_2-udvikling og manometrisk respirometri skal udtages fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der først og fremmest behandler husholdningsspildevand. Inoculum fra andre kilder har vist sig at føre til større spredning af resultaterne. Til den modificerede OECD-screening og Closed Bottle-testen kræves der et mere fortyndet inoculum uden slampartikler, og som kilde foretrækkes sekundært afløbsvand fra et rensningsanlæg for

husholdningsspildevand eller et anlæg i laboratorieskala. Til MITI-testen fremstilles inoculum fra en blanding af kilder, hvilket er beskrevet under denne specifikke test.

I.6.4.1. *Inoculum fra aktivt slam*

Der udtages en frisk prøve af aktivt slam fra beluftningstanken ved et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Om nødvendigt fjern grove partikler fra ved filtrering gennem en finmasket sigte og hold herefter slammet aerobt.

Alternativt kan slammet henstå til bundfældning eller centrifugeres (f.eks. ved 1 100 g i 10 min), efter at grove partikler er fjernet. Supernatanten fjernes. Slammet kan vaskes i uorganisk medium. Det koncentrerede slam opslæmmes til en koncentration på 3-5 g opslæmmet tørstof pr. liter, hvorefter det beluftes indtil anvendelse.

Slammet skal tages fra et ordentligt fungerende normalt anlæg. Slammet vaskes, hvis det er nødvendigt at tage det fra et stærkt belastet rensningsanlæg, eller et renseanlæg som menes at indeholde hæmmende stoffer. Det genopslæmmede slam henstår til bundfældning eller centrifugeres efter grundig blanding, supernatanten fjernes, og det vaskede slam genopslæmmes i uorganisk medium. Denne fremgangsmåde gentages, indtil slammet menes at være fri for overskud af substrat eller hæmmende stoffer.

Lige før brugen udtages der en prøve af det fuldstændigt genopslæmmede slam eller af det ubehandlede slam, til bestemmelse af mængden af opslæmmet tørstof.

Et andet alternativ er at homogenisere aktivt slam (3-5 g opslæmmet tørstof pr. liter). Slammet behandles i en mekanisk blender i 2 minutter ved middel hastighed. Det homogeniserede slam henstår til bundfældning i 30 min. eller om nødvendigt længere, og væsken dekanteres fra til brug som inoculum i en mængde på 10 ml pr. liter uorganisk medium.

I.6.4.2. *Andre inoculumkilder*

Det kan fremstilles af sekundært afløbsvand fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Der udtages en frisk prøve, der opbevares under aerobe forhold under transporten. Den henstår til bundfældning i 1 time eller filtreres gennem et groft papirfilter, og denne væske opbevares under aerobe forhold indtil brugen. Op til 100 ml af denne inoculumtype kan bruges pr. liter medium.

Overfladevand er en yderligere inoculumkilde. I dette tilfælde udtages en prøve af egnet overfladevand, f.eks. flod- eller søvand, som opbevares under aerobe forhold indtil anvendelsen. Om nødvendigt kan inoculum koncentreres ved filtrering eller centrifugering.

I.6.5. **Forkonditionering af inoculum**

De fremstillede inoculum kan forkonditioneres til forsøgsbetingelserne, men må ikke tilvænnes til testkemikaliet. Forkonditioneringen består i beluftning af aktivt slam i uorganisk medium eller af sekundært afløbsvand i 5-7 dage ved stuetemperatur. Undertiden gør forkonditionering metoderne mere præcise, idet blindværdierne reduceres. Det anses for unødvendigt at forkonditionere MITI- inoculum.

I.6.6. **Abiotiske kontrolprøver**

Om nødvendigt foretages der kontrol af eventuel abiotisk nedbrydning af teststoffet ved bestemmelse af DOC-tab, oxygenoptagelse og kuldioxidudvikling i sterile kontrolprøver, der ikke indeholder inoculum. Der steriliseres ved membranfiltrering (0,2-0,45 µm) eller ved tilsætning af et passende toksisk stof i passende koncentration. Hvis der benyttes membranfiltrering skal prøverne tages aseptisk for at opretholde steriliteten. Med mindre adsorption af teststoffet i forvejen er blevet udelukket, skal tests som måler bionedbrydning som DOC-fjernelse, inkludere en abiotisk kontrol som inoculeres og forgiftes. Dette gælder særligt for inocula med aktiveret slam.

I.6.7. **Antal kolber**

For hver test er antallet af kolber i en typisk forsøgsrække beskrevet under den enkelte metode.

Følgende typer af kolber kan bruges:

testopslæmning: indeholder teststof og inoculum

inoculumblind: indeholder kun inoculum

procedurekontrol: indeholder referencestof og inoculum

abiotisk steril kontrol: sterile, indeholder teststof (I.6.6.)

adsorptionskontrol: indeholder teststof, inoculum og steriliserende stof

toksicitetskontrol: indeholder teststof, referencestof og inoculum

Bestemmelser i testopslæmning og inoculumblind skal obligatorisk foretages sideløbende. Det anbefales ligeledes at foretage sideløbende bestemmelser i den anden flaske.

Det er dog ikke altid muligt. Man må sørge for, at der udtages tilstrækkeligt med prøver eller foretages tilstrækkeligt mange aflæsninger til, at den procentvise eliminering i 10-dages vinduet kan vurderes.

I.7. DATA OG EVALUERING

Ved beregning af den procentvise nedbrydning D_t anvendes gennemsnitsværdierne af dobbeltbestemmelserne af parameteren i testopslæmningen og inoculumblindprøven. Formlerne er givet i afsnittene om de enkelte testmetoder. Nedbrydningens forløb vises grafisk med angivelse af 10-dages vinduet. Den procentvise eliminering ved afslutningen af 10-dages vinduet og ved plateauet eller testens afslutning beregnes og rapporteres.

I de respirometriske test kan nitrogenholdige forbindelser indvirke på oxygenoptagelsen som følge af nitrifikation (se bilag II og V).

I.7.1. **Nedbrydning målt ved bestemmelse af DOC**

Den procentuelle nedbrydning (D_t) på ethvert prøvetagningstidspunkt skal beregnes særskildt for kolberne, som indeholder teststof, idet gennemsnitsværdierne af dobbeltbestemmelserne af DOC benyttes for at kunne bedømme pålideligheden af testen (se I.5.2.). Den beregnes ved at bruge følgende udtryk:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

hvor:

D_t = % nedbrydning til tidspunktet t

C_o = gennemsnitlig startkoncentration af DOC i kulturmediet med teststof og inoculum (mg DOC/l)

C_t = gennemsnitskoncentration af DOC i kulturmediet med teststof og inoculum til tidspunktet t (mg DOC/l)

C_{bo} = gennemsnitlig startkoncentration af DOC i blindprøve med uorganisk medium og inoculum (mg DOC/l)

C_{bt} = gennemsnitskoncentration af DOC i blindprøve med uorganisk medium og inoculum til tidspunktet t (mg DOC/l).

Alle koncentrationer bestemmes eksperimentelt.

I.7.2. **Nedbrydning målt ved specifik analyse**

Når der foreligger specifikke analysedata, beregnes den primære bionedbrydning ved udtrykket:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

hvor

D_t = % nedbrydning til tidspunktet t, normalt 28 dage

S_a = restmængde teststof i medium med inoculum ved testens afslutning (mg)

S_b = restmængde teststof i blindprøve kun med vand/medium og teststof (mg)

I.7.3. **Abiotisk nedbrydning**

Når en abiotisk kontrol bruges, beregnes den procentuelle abiotiske nedbrydning ved at bruge

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

hvor

$C_{s(o)}$ = DOC-koncentrationen, sterilkontrollen på dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentrationen, sterilkontrollen på dag t

I.8. RAPPORTERING

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— test- og referencekemikalie og deres renhed

— testbetingelser

— inoculum: art og udtagningssted(er), koncentration og eventuel forkonditionering

— art og andel af industrispildevand i afløbsvandet, hvis kendt

— testens varighed og temperatur

— for tungt opløselige testkemikalier, den foretagene behandling

— anvendt testmetode; ændringer i fremgangsmåden skal begrundes videnskabeligt

— forsøgsresultater i skema

— eventuelt iagttagne hæmningsfænomener

— eventuelt iagttagen abiotisk nedbrydning

— eventuelle data fra specifikke kemiske analyser

— om muligt analytiske data vedrørende nedbrydningsprodukter

— afbildning af den procentvise nedbrydning mod tiden for både test- og referencestof med tydelig angivelse af lag-periode, nedbrydningstid, 10-dages vindue og hældning (se bilag I). Hvis der i testen benyttes pålidelighedskriterier kan gennemsnittet af nedbrydningsprocenterne i kolberne indeholdende teststoffet benyttes til fremstilling af grafen.

— procentvis eliminering efter 10-dages vinduet og ved enten plateau eller testens afslutning.

DEL II. DOC-ELIMINERING (Metode C.4-A)

II.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (10-40 mg/l) beluftes i mørke eller dæmpet lys ved 22 ± 2 °C.

Nedbrydningen følges ved hyppig DOC-analyse i en periode på 28 dage. Bionedbrydningsgraden beregnes ved at udtrykke koncentrationen af fjernet DOC (korrigeret for koncentrationen i inoculumblindprøven) i procent af startkoncentrationen af DOC. Den primære bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende kemisk analyse ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

II.2. BESKRIVELSE AF METODEN

II.2.1. Apparatur

(a) Koniske kolber, f.eks. 250 ml op til 2 l, afhængigt af det volumen, der kræves til DOC-analyse

(b) Rysteapparat til de koniske kolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller anbragt i et lokale med konstant temperatur, og tilstrækkelig kraftigt til, at forholdene holdes aerobe i alle kolberne

(c) Filtreringsapparatur med passende membraner

(d) DOC-analysator

(e) Apparatur til bestemmelse af opløst oxygen

(f) Centrifuge.

II.2.2. Fremstilling af uorganisk medium

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

II.2.3. Fremstilling og forkonditionering af inoculum

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

II.2.4. Klargøring af kolberne

Eksempelvis kan der overføres 800 ml portioner af uorganisk medium til koniske 2-liters kolber, hvorefter der tilsættes så meget af stamopløsningerne af test- og referencestof til de forskellige kolber, at kemikaliekoncentrationen bliver på 10-40 mg DOC pr. liter. Kontroller pH-værdier og juster om nødvendigt til 7,4. Der tilsættes inoculum fra aktivt slam eller en anden kilde (se I.6.4) til en slutkoncentration på højst 30 mg opslæmmet tørstof pr. liter. Der klargøres også inoculumkontrolprøver i uorganisk medium uden test- og referencekemikalier.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af, om testkemikaliet har en hæmmende virkning, ved tilsætning af omtrent lige store mængder test- og referencekemikalie til uorganisk medium indeholdende inoculum.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe, dvs. en kolbe uden inoculum, til undersøgelse af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6,6.).

Hvis testkemikaliet mistænkes for i væsentlig grad at kunne adsorberes til glas, slampartikler el. lign., foretages desuden en indledende vurdering af denne adsorption og dermed af testens egnethed for det pågældende testkemikalie (se tabel 1). Benyt en flaske indeholdende teststoffet, inoculum og det steriliserende stof.

Alle kolber fyldes op til 1 liter med uorganisk medium, og efter blanding udtages der en prøve af hver kolbe til bestemmelse af startkoncentrationen af DOC (se bilag II, punkt 4). Kolbernes åbning tildækkes, f.eks. med aluminiumfolie, på en sådan måde, at luften frit kan passere ind og ud af kolberne. Dernæst startes testen ved, at kolberne anbringes i rysteapparatet.

II.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Flaske 1 og 2: testopslæmning

Flaske 3 og 4: inoculumblind

Flaske 5: procedurekontrol

Anbefalet og om nødvendigt:

Flaske 6: abiotisk steril kontrol

Flaske 7: adsorptionskontrol

Flaske 8: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

II.2.6. **Gennemførelse af testen**

Under testens forløb foretages der dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i alle kolberne med bestemte tidsintervaller og så ofte, at både 10-dages vinduets start og den procentvise fjernelse ved 10-dages vinduets afslutning kan konstateres. Der udtages kun netop så meget af testopslæmningen, som er nødvendigt til analysen.

Inden prøveudtagningen kompenseres der for eventuelt fordampningstab fra kolberne ved tilsætning af vand (I.6.1). Inden prøven udtages, blandes kulturmediet omhyggeligt, idet det påses, at materiale på kolbens sider først bringes i opløsning eller opslæmning. Der centrifugeres eller filtreres på membranfilter (se tillæg II.4) straks efter prøveudtagningen. Den filtrerede eller centrifugerede prøve analyseres samme dag; ellers kan den opbevares i højst 48 timer ved 2-4 °C eller i længere tid ved højst – 18 °C.

II.3. DATA OG RAPPORTERING

II.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den procentvise nedbrydning til tidspunktet t beregnes som anført under I.7.1. (DOC-bestemmelse) og eventuelt som under I.7.2. (specifik analyse).

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

II.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Se I.5.2.

II.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

II.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

DOC-ELIMINERING

1. LABORATORIUM

2. DATO VED TESTENS BEGYNDELSE

3. TESTSTOF

Navn:

Stamopløsningens koncentration: ... mg/l stof

Begyndelseskoncentration i mediet, t_o: ... mg/l stof

4. INOCULUM

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: ... mg/l

5. KULSTOFBESTEMMELSER

Kulstofanalysator:

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalie plus inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, gnsn. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, gnsn. $C_{b(t)}$					
Inoculumblindprøve uden testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, gnsn. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, gnsn. $C_{d(t)}$					
	$C_{b(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VURDERING AF RÅDATA

Kolbe nr.		% nedbrydning efter n dage				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Gnsn. (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Gennemsnittet af D_1 og D_2 skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

Anmærkning: Der kan benyttes tilsvarende formler for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

7. **ABIOTISK KONTROL** (frivillig)

	Tid (dage)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYSE** (frivillig)

	restmængde af teststof ved afslutning af test (mg/l)	% primær nedbrydning
Sterilkontrol	S_b	
Inoculeret testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL III. MODIFICERET OECD-SCREENINGTEST (Metode C.4-B)

III.1. METODENS PRINCIP

Til en afmålt mængde uorganisk medium indeholdende teststof i kendt koncentration (10-40 mg/l) som den nominelle eneste organisk kulstofkilde, tilsættes der 0,5 ml spildevandsinoculum pr. liter. Blandingen beluftes i mørke eller dæmpet lys ved 22 ± 2 °C.

Nedbrydningen følges ved hyppig DOC-analyse i en periode på 28 dage. Bionedbrydningsgraden beregnes ved at udtrykke koncentrationen af fjernet DOC (korrigeret for koncentrationen i inoculumblindprøven) i procent af startkoncentrationen af DOC. Den primære bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende kemisk analyse ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

III.2. BESKRIVELSE AF METODEN

III.2.1. **Apparatur**

(a) Koniske kolber, f.eks. 250 ml op til 2 l, afhængigt af det volumen, der kræves til DOC-analyse

(b) Rysteapparat til de koniske kolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller anbragt i et lokale med konstant temperatur, og tilstrækkelig kraftigt til, at forholdene holdes aerobe i alle kolberne

(c) Filtreringsapparatur med passende membraner

(d) DOC-analysator

(e) Apparatur til bestemmelse af opløst oxygen

(f) Centrifuge.

III.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

I denne metode anvendes der kun 0,5 ml spildevand pr. liter som inoculum, og derfor kan det være nødvendigt at tilsætte yderligere sporstoffer og vækstfaktorer til mediet. Dette gøres ved tilsætning af 1 ml af hver af følgende opløsninger pr. liter medium (slutvolumen).

Opløsning af sporstoffer:

Mangansulfat tetrahydrat, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Borsyre, H_3BO_4	57,2 mg
Zinksulfat heptahydrat, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdat $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Jernchelat ($FeCl_3$ ethylendiamintetraeddikesyre)	100,0 mg

opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml.

Vitaminopløsning:

Gærekstrakt 15,0 mg

opløses i 100 ml vand. Der steriliseres ved filtrering igennem 0,2 µm membranfilter, hvis opløsningen friskfremstilles hver gang.

III.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inokulum tages fra det sekundære afløb fra et spildevandsanlæg eller et laboratorieanlæg, som fortrinsvis modtager husholdningsspildevand. Se I.6.4.2 og I.6.5.

0,5 ml pr. liter uorganisk næringsstofopløsning benyttes.

III.2.4. **Klargøring af kolberne**

Eksempelvis kan der overføres 800 ml portioner af uorganisk medium til koniske 2-liters kolber, hvorefter der tilsættes så meget af stamopløsningerne af test- og referencestof til de forskellige kolber, at kemikaliekoncentrationen bliver på 10-40 mg DOC pr. liter. Kontroller pH-værdier og juster om nødvendigt til 7,4. Der tilsættes 0,5 ml spildevand pr. liter (se I.6.4.2.) til kolberne som inoculum. Der klargøres også inoculumkontrolprøver i uorganisk medium uden test- og referencekemikalier.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes omtrent lige store mængder test- og referencekemikalie til uorganisk medium indeholdende inoculum.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe, dvs. en kolbe uden inoculum, til kontrol af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6.).

Hvis testkemikaliet mistænkes for i væsentlig grad at kunne adsorberes til glas, slampartikler el. lign., foretages desuden en indledende vurdering af denne adsorption og dermed af testens egnethed for det pågældende testkemikalie (se tabel 1). Benyt en kolbe indeholdende teststoffet, inoculum og det steriliserende stof.

Alle kolber fyldes op til 1 liter med uorganisk medium, og efter blanding udtages der en prøve af hver kolbe til bestemmelse af startkoncentrationen af DOC (se tillæg II, punkt 4). Kolbernes åbning tildækkes, f.eks. med aluminiumfolie, på en sådan måde, at luften frit kan passere ind og ud af kolberne. Dernæst startes testen ved, at kolberne anbringes i rysteapparatet.

III.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Flaske 1 og 2: testopslæmning

Flaske 3 og 4: inoculumblind

Flaske 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Flaske 6: abiotisk steril kontrol

Flaske 7: adsorptionskontrol

Flaske 8: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

III.2.6. **Gennemførelse af testen**

Under testens forløb foretages der dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i alle kolberne med bestemte tidsintervaller og så ofte, at både 10-dages vinduets start og den procentvise fjernelse ved 10-dages vinduets afslutning kan konstateres. Der udtages kun netop så meget af testopslæmningen, som er nødvendig til analysen.

Inden prøveudtagningen kompenseres der for eventuelt fordampningstab fra kolberne ved tilsætning af fortyndingsvand (I.6.1.). Inden prøven udtages, blandes kulturmediet omhyggeligt, idet materiale på kolbens sider først bringes i opløsning eller opslæmning. Der centrifugeres eller filtreres på membranfilter (se bilag II.4.) straks efter prøveudtagningen. Den filtrerede eller centrifugerede prøve analyseres samme dag; ellers kan den opbevares i højst 48 timer ved 2-4 °C eller i længere tid ved højst – 18 °C.

III.3. DATA OG RAPPORTERING

III.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den procentvise nedbrydning til tidspunktet t beregnes som anført under I.7.1. (DOC-bestemmelse) og eventuelt som under I.7.2. (specifik analyse).

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

III.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Se I.5.2.

III.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

III.4. **RESULTATSKEMA**

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MODIFICERET OECD-SCREENINGTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: ... mg/l stof

Begyndelseskoncentration i mediet, t_0: ... mg/l stof

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: ... mg/l

5. **KULSTOFBESTEMMELSER**

Kulstofanalysator:

	Kolbe nr.		DOC efter n dage (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalie plus inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, gnsn. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, gnsn. $C_{b(t)}$					
Inoculum-blindprøve uden testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, gnsn. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, gnsn. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VURDERING AF RÅDATA

Kolbe nr.		% nedbrydning efter n dage				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Gnsn. (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Gennemsnittet af D_1 og D_2 skal ikke tages hvis der er en betydelig forskel.

Anmærkning: Der kan benyttes tilsvarende formler for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

7. ABIOTISK KONTROL (frivillig)

	Tid (dage)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisker nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIK KEMISK ANALYSE (frivillig)

	restmængde af teststof ved afslutning af test	% primær nedbrydning
Sterilkontrol	S_b	
Inoculeret testmedium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL IV. CO_2-UDVIKLING (Metode C.4-C)

IV.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (10-20 mg DOC eller TOC/l) beluftes ved gennemledning af kuldioxidfri luft med kontrolleret hastighed i mørke eller i diffust lys. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved bestemmelse af den dannede mængde kuldioxid, idet den opsamles i barium- eller natriumhydroxid og måles enten ved titrering af det resterende hydroxid eller som uorganisk kulstof. Den mængde kuldioxid, som er udviklet af testkemikaliet (korrigeret for inoculumblindværdien), udtrykkes i procent af $ThCO_2$. Graden af bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende DOC-analyser ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

IV.2. BESKRIVELSE AF METODEN

IV.2.1. Apparatur

(a) Kolber, 2-5 l, alle forsynet med beluftningsrør, der næsten når ned til bunden af beholderen, og afgangsåbning

(b) Magnetomrørere, når der testes tungtopløselige kemikalier

(c) Gasabsorptionsflasker

(d) Udstyr til styring og måling af luftgennemstrømning

(e) Apparatur til udvaskning af kuldioxid, til fremstilling af kuldioxidfri luft; alternativt kan der benyttes CO_2-fri oxygen og CO_2-fri nitrogen på stålflaske i det rette blandingsforhold (20 % O_2 og 80 % N_2)

(f) Udstyr til bestemmelse af kuldioxid, enten titrimetrisk eller ved en eller anden form for analysator for uorganisk kulstof

(g) Membranfiltreringsapparatur (valgfrit)

(h) DOC-analysator (valgfri)

IV.2.2. Fremstilling af uorganisk medium

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

IV.2.3. Fremstilling og forkonditionering af inoculum

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

IV.2.4. Klargøring af kolberne

Følgende volumen- og vægtangivelser gælder som eksempel for 5-liters kolber med 3 l opslæmning. Anvendes der mindre rumfang, tilpasses værdierne, dog skal den dannede mængde kuldioxid kunne bestemmes nøjagtigt.

Der overføres 2 400 ml uorganisk medium til hver 5-liters kolbe. Der tilsættes så meget klargjort aktivt slam (se I.6.4.1 og I.6.5), at koncentrationen af opslæmmet tørstof bliver højst 30 mg/l i de 3 liter slutblanding. Alternativt kan det klargjorte slam først fortyndes med uorganisk medium til en opslæmning indeholdende

500-1 000 mg/l, hvorefter en del heraf tilsættes til 5-liters kolbens indhold til en koncentration på 30 mg/l; dette giver større nøjagtighed. Der kan benyttes andre inoculumkilder (se I.6.4.2).

Disse blandinger beluftes natten over med CO_2-fri luft, så al kuldioxiden drives ud af systemet.

Test- og referencestof tilsættes hver for sig som v.h.a. kendte mængder af stamopløsninger til replika-kolberne, så der opnås en koncentration på 10-20 mg DOC eller TOC pr. liter; til nogle af kolberne tilsættes der ingen kemikalier, og de fungerer som inoculumkontrolprøver. Tungtopløselige teststoffer tilsættes direkte til kolberne på vægt- eller volumenbasis, eller håndteres som beskrevet i bilag III.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes både test- og referencekemikalie til samme koncentration som i de andre kolber.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe, dvs. en kolbe uden inoculum, til kontrol af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6). Steriliser ved tilsætning af et giftigt stof i en passende koncentration.

I alle kolberne fyldes der op til et opslæmningsvolumen på 3 l ved tilsætning af uorganisk medium, der i forvejen er gennemluftet med CO_2-fri luft. Der kan eventuelt udtages prøver til DOC-analyse (se bilag II.4) og/eller specifik analyse. Absorptionsflaskerne forbindes til kolbernes afgangsåbning.

Hvis der anvendes bariumhydroxid, serieforbindes der 3 absorptionsflasker med hver 100 ml 0,0125 M bariumhydroxidopløsning til hver 5-liters kolbe. Opløsningen skal være fri for bundfald af sulfat og carbonat, og dens styrke skal bestemmes umiddelbart før brugen. Anvendes der natriumhydroxid forbindes der 2 fælder, hvor den sidste fungerer som kontrol af, at al kuldioxiden er absorberet i den første. Absorptionsflasker med serumflaskelukker er egnede. Der anbringes 200 ml 0,05 M natriumhydroxid i hver flaske, hvilket er tilstrækkeligt til at absorbere hele den mængde kuldioxid, der udvikles, når testkemikaliet nedbrydes fuldstændigt. Selv en friskfremstillet natriumhydroxidopløsning vil altid indeholde spor af carbonat; dette korrigeres der for ved subtraktion af blindprøvens carbonatindhold.

IV.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Flaske 1 og 2: testopslæmning

Flaske 3 og 4: inoculumblind

Flaske 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Flaske 6: abiotisk steril kontrol

Flaske 7: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

IV.2.6. **Gennemførelse af testen**

Testen indledes ved gennembobling af opslæmningerne med 30-100 ml CO_2-fri luft pr. minut. Der udtages regelmæssigt prøver af kuldioxidabsorbenten til analyse for CO_2-indhold. Det anbefales, at der i de første 10 dage foretages analyser hver anden eller tredje dag og derefter hver femte dag indtil den 28. dag, således at 10-dages vinduet kan identificeres.

På den 28. dag udtages der (eventuelt) prøver til DOC-analyse og/eller specifik analyse, opslæmningernes pH måles, og der tilsættes 1 ml koncentreret saltsyre til hver kolbe; kolberne beluftes natten over, så al kuldioxid drives ud af testopslæmningerne. På den 29. dag foretages den sidste analyse af udviklet kuldioxid.

På de dage, hvor CO_2 bestemmes, fjernes den bariumhydroxidabsorptionsflaske, der er nærmest kolben, og indholdet titreres med 0,05 M HCl med phenolphthalein som indikator. De øvrige absorptionsflasker rykkes én plads nærmere kolben, og der anbringes en ny flaske indeholdende 100 ml friskfremstillet 0,0125 M bariumhydroxyd bagest i serien. Titreringerne foretages efter behov, f.eks. når der er betragteligt bundfald i den første flaske og intet synligt i den anden, dog mindst én gang ugentligt. Anvendes der NaOH som absorptionsmiddel udtages der med en injektionssprøjte en lille prøve (afhængigt af den anvendte kulstofanalysator) af natriumhydroxidopløsningen i den flaske, der er nærmest ved kolben. Prøven sprøjtes ind i IC-delen af kulstofanalysatoren til direkte analyse af den udviklede kuldioxid.

Indholdet af den anden absorptionsflaske analyseres først ved testens afslutning, så der kan korrigeres for eventuel overførsel af kuldioxid.

IV.3. DATA OG RAPPORTERING

IV.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den absorberede CO_2-mængde er efter titrering givet ved:

$$mg\ CO_2 = [(100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A)] \times 44$$

hvor:

V = den mængde HCl, der forbruges til titrering af de 100 ml absorptionsmiddel (ml)

C_B = bariumhydroxidopløsningens koncentration (M)

C_A = saltsyreopløsningens koncentration (M).

Hvis C_B = 0,0125 M og C_A = 0,05 M, skal der anvendes 50 ml til titrering af 100 ml bariumhydroxid, og CO_2-mængden er givet ved:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl til titrering} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

I dette tilfælde skal der altså anvendes en faktor på 1,1 ved omregning fra det rumfang HCl, der medgår til titrering, til det antal mg CO_2, der er udviklet.

Den vægtmængde CO_2, der dannes af inoculum alene og af inoculum plus testkemikalie, beregnes ud fra de pågældende titreringsværdier, og forskellen er den vægtmængde CO_2, som testkemikaliet alene udvikler.

Hvis f.eks. inoculum alene kræver 48 ml til titreringen og inoculum plus testkemikalie kræver 45 ml, fås

CO_2 fra inoculum = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

CO_2 fra inoculum plus testkemikalie = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg,

og den vægtmængde CO_2, som testkemikaliet har udviklet, bliver altså 3,3 mg.

Den procentvise bionedbrydning beregnes ved:

$$\%\ \text{nedbrydning} = \frac{\text{mg udviklet } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg tilsat testkemikalie}}$$

eller

$$\%\ \text{nedbrydning} = \frac{\text{mg udviklet } CO_2 \times 100}{\text{mg tilsat TOC i testen} \times 3{,}67}$$

idet 3,67 er omregningsfaktoren (44/12) fra kulstof til kuldioxid.

Den procentvise nedbrydning efter et givet tidsrum beregnes ved summering af de enkelte procentdele af $ThCO_2$, der er målt indtil det pågældende tidspunkt.

Anvendes der natriumhydroxid som absorptionsmiddel, beregnes den udviklede CO_2- mængde, udtrykt som IC (mg), ved multiplikation af absorptionsmidlets IC- koncentration med dets volumen.

Den procentvise nedbrydning beregnes ved:

$$\% \ ThCO_2 = \frac{\text{mg IC i testkolbe} - \text{mg IC i blindprøve}}{\text{mg TOC tilsat som testkemikalie}} \times 100$$

Det fjernede DOC beregnes (eventuelt) som beskrevet under 1.7. Dette og alle øvrige resultater noteres på de tilhørende skemaer.

IV.3.2. **Resultaternes gyldighed**

IC-indholdet i testkemikalieopslæmningen i uorganisk medium ved testens begyndelse skal være mindre end 5 % af TC, og den udviklede CO_2-mængde i inoculumblindprøven må ved testens afslutning normalt ikke overstige 40 mg pr. liter medium. Hvis der findes værdier på over 70 mg CO_2 pr. liter, gennemgås data og forsøgsteknikker kritisk.

Se også I.5.2.

IV.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

IV.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

KULDIOXIDUDVIKLING

1. LABORATORIUM

2. DATO VED TESTENS BEGYNDELSE

3. TESTSTOF

   Navn:

   Stamopløsningens koncentration: ... mg/l stof

   Begyndelseskoncentration i mediet: ... mg/l stof

   Total C tilsat til kolben: ... mg C

   $ThCO_2$: ... mg CO_2

4. INOCULUM

   Kilde: ...

   Behandling: ...

   Eventuel forkonditionering: ...

   Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: ... mg/l

5. KULDIOXIDUDVIKLING OG NEDBRYDELIGHED

Metode: $Ba(OH)_2$/NaOH/andet

Tid (dage)	udviklet CO_2 test (mg)		udviklet CO_2 blind (mg)		udviklet CO_2 kumuleret (mg) (test minus blindprøve)		% $ThCO_2$ $\frac{\text{kumuleret } CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	gnsn.	3 / 4	gnsn.	1	2	1	2	gnsn.
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Anmærkning: Der kan benyttes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

6. KULSTOFANALYSE (valgfri)

Kulstofanalysator:

Tid (dage)	Blindprøve mg/l	Testkemikalie mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) eller ved inkuberingens afslutning		

$$\% \text{ DOC fjernet} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. ABIOTISK NEDBRYDNING (valgfri)

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{CO_2\text{-udvikling i steril kolbe efter 28 dage (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

DEL V. MANOMETRISK RESPIROMETRI (Metode C.4-D)

V.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (100 mg teststof pr. liter svarende til mindst 50-100 mg ThOD pr. l) omrøres i en lukket kolbe ved konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i op til 28 dage. Oxygenforbruget bestemmes enten ved måling af den mængde oxygen (fremstillet elektrolytisk), der kræves til opretholdelse af konstant gasvolumen i respirometerkolben, eller ud fra volumen- eller trykændringen (eller en kombination af dem) i apparatet. Udviklet kuldioxid absorberes i en kaliumhydroxidopløsning eller andet egnet absorptionsmiddel. Den oxygenmængde, testkemikaliet har optaget, (korrigeret for den parallelle inoculumblindprøves optagelse) udtrykkes som procent af ThOD eller COD. Frivilligt kan primær bionedbrydning også beregnes ved supplerende specifik analyse ved begyndelsen og slutningen af inkuberingen, og fuldstændig bionedbrydning ved analyse af DOC.

V.2. BESKRIVELSE AF METODEN

V.2.1. Apparatur

(a) Egnet respirometer

(b) Temperaturregulering inden for ± 1 °C eller mindre

(c) Membranfiltreringsapparatur (valgfrit)

(d) Kulstofanalysator (valgfri).

V.2.2. Fremstilling af uorganisk medium

Se I.6.2. om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

V.2.3. Fremstilling og forkonditionering af inoculum

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

V.2.4. Klargøring af kolberne

Ud fra stamopløsningerne fremstilles der særskilte opløsninger af test- og referencestof i uorganisk medium med en kemikaliekoncentration på normalt 100 mg/l (svarende til mindst 50-100 mg ThOD pr. l).

ThOD beregnes ud fra dannelsen af ammoniumsalte, medmindre der forventes nitrifikation; i så fald baseres beregningen på nitratdannelsen (se bilag II.2).

pH måles og justeres om nødvendigt til 7,4 ± 0,2.

Tungtopløselige stoffer tilsættes på et senere tidspunkt (se nedenfor).

Hvis teststoffets toksicitet skal bestemmes, fremstilles endnu en opløsning i uorganisk medium, som indeholder både test- og referencestof i samme koncentration som i de enkelte opløsninger.

Hvis bestemmelse af den fysisk-kemiske oxygenoptagelse er påkrævet, fremstilles der en opløsning af teststof i en koncentration på normalt 100 mg ThOD pr. l som er blevet steriliseret ved tilsætningen af et passende giftigt stof (se I.6,6.).

Den nødvendige mængde af henholdsvis test- og referencestofopløsningerne overføres til mindst to kolber (dobbeltbestemmelse). Der klargøres yderligere kolber med uorganisk medium alene (inoculumblindprøver) og hvis nødvendigt med den blandede test- og referencestofopløsning og med den sterile opløsning.

Hvis teststoffet er tungtopløseligt, tilsættes det direkte på dette tidspunkt, enten på vægtbasis eller volumenbasis, eller ved håndtering som beskrevet i bilag III. Der tilsættes kaliumhydroxid, natriumhydroxidperler eller et andet absorptionsmiddel til CO_2-absorbtionskamrene.

V.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Flaske 1 og 2: testopslæmning

Flaske 3 og 4: inoculumblind

Flaske 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Flaske 6: abiotisk steril kontrol

Flaske 7: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

V.2.6. **Gennemførelse af testen**

Beholderne henstår, indtil de har nået den ønskede temperatur, og der tilsættes klargjort aktivt slam eller et andet inoculum til de pågældende beholdere, så der opnås en koncentration af opslæmmet tørstof på højst 30 mg/l. Apparaturet samles, omrøringen sættes i gang, der kontrolleres for lufttæthed, og oxygenoptagelsesmålingen påbegyndes. Normalt kræves der ikke anden pasning end de nødvendige aflæsninger og daglig kontrol af, at temperaturen er korrekt og omrøringen tilstrækkelig.

Oxygenoptagelsen beregnes på grundlag af hyppige regelmæssige aflæsninger, foretaget efter apparaturfabrikantens anvisninger. Ved inkubationsperiodens afslutning, normalt 28 dage, måles pH i kolberne, navnlig hvis oxygenoptagelsen er meget lav eller større end $ThOD_{NH4}$ (for nitrogenholdige forbindelser).

Om nødvendigt udtages der før og efter inkuberingen prøver fra respirometerkolberne til DOC-analyse eller specifik kemisk analyse (se bilag II.4). Man skal sørge for, at rumfanget af den testopslæmning, der er tilbage i kolben efter den første prøveudtagning, er kendt. Hvis teststoffet er N- holdigt, bestemmes koncentrationsforøgelsen af nitrit og nitrat over 28 dage, og korrektionen for oxygenforbruget ved nitrifikation beregnes (bilag V).

V.3. DATA OG RAPPORTERING

V.3.1. **Behandling af resultaterne**

Testkemikaliets oxygenoptagelse (mg) efter et givet tidsrum (korrigeret for inoculumblindprøvens oxygenoptagelse i samme tidsrum) divideres med vægten af den anvendte teststofmængde. Herved fremkommer BOD udtrykt i mg oxygen pr. mg teststof, dvs.

$$BOD = \frac{\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststof} - \text{mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven}}{\text{mg teststof i kolben}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ pr. mg teststof.}$$

Den procentvise bionedbrydning beregnes enten ved:

$$\% \text{ bionedbrydning} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg kemikalie)}} \times 100,$$

eller

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kemikalie)}}{\text{COD (mg } O_2\text{/mg kemikalie)}} \times 100$$

Det bemærkes, at de to metoder ikke nødvendigvis giver samme resultat; førstnævnte metode bør foretrækkes.

Der benyttes den ThOD (NH_4 eller NO_3), der svarer til det foreliggende kendskab til nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

Hvis det vælges at foretage bestemmelser af organisk kulstof og/eller af et specifikt kemikalie, beregnes den procentvise nedbrydning som beskrevet under punkt I.7.

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

V.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygenoptagelse er normalt 20-30 mg O_2/l på 28 dage og bør ikke være større end 60 mg/l. Findes der værdier over 60 mg/l, må data og forsøgsteknikker gennemgås kritisk. Hvis pH ligger uden for intervallet 6-8,5 og teststoffets oxygenoptagelse er mindre end 60 %, gentages testen med lavere teststofkoncentration.

Se også I.5.2.

V.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

V.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MANOMETRISK RESPIROMETRI

1. LABORATORIUM
2. DATO VED TESTENS BEGYNDELSE
3. TESTSTOF

   Navn:

   Stamopløsningens koncentration: ... mg/l

   Begyndelseskoncentration i mediet, C_o: ... mg/l

   Volumen i test kolbe (V): ... ml

   ThOD eller COD: ... mg O_2/mg test-stof (NH_4, NO_3)

4. INOCULUM

   Kilde: ...

   Behandling: ...

   Eventuel forkonditionering: ...

   Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: ... mg/l

5. OXYGENOPTAGELSE: BIONEDBRYDELIGHED

		Tid (dage)											
		0		7		14			21			28	
O_2 opt. (mg) teststof	1												
	2												
	a, gnsn.												
O_2 opt. (mg) blindprøve	3												
	4												
	b, gnsn.												
Korrigeret BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD pr. mg teststof	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
% nedbrydning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Gnsn. *												
V = volumen af medium i testkolben													

* Gennemsnittet af D_1 og D_2 skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

Anmærkning: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

6. KORREKTION FOR NITRIFIKATION (se bilag V)

Dag	0	28	forskel
(i) Nitratkoncentration (mg N/l)			(N)
(ii) Oxygenækvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii) Nitritconzentration (mg N/l)			(N)
(iv) Oxygenækvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv) Total oxygenækvivalent	—	—	

7. KULSTOFANALYSE (valgfri)

Kulstofanalysator:

Tid (dage)	Blindprøve mg/l	Testkemikalie mg/l
0	(C_{bio})	(C_o)
28 (*)	(C_{bit})	(C_t)
(*) eller ved inkuberingens afslutning		

$$\% \text{ DOC fjernet} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMIKALIEBESTEMMELSE** (valgfri)

S_b = koncentrationen af testkemikalie i steril kontrolkolbe efter 28 dage

S_a = koncentrationen af testkemikalie i kolbe med inoculum efter 28 dage

$$\% \text{ bionedbrydning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISK NEDBRYDNING** (valgfri)

a = oxygenforbruget i sterile kolber efter 28 dage (mg)

$$\text{Oxygenforbrug pr. mg teststof} = \frac{a}{C_o V}$$

(se afsnit 1 og 3)

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

DEL VI. CLOSED BOTTLE TEST (metode C.4-E)

VI.1. TESTMETODENS PRINCIP

Til en sædvanligvis 2-5 mg/l opløsning af teststoffet i uorganisk medium tilsættes der inoculum bestående af et forholdvis lille antal mikroorganismer fra en blandet population, og opløsningen opbevares i mørke ved konstant temperatur i helt fyldte lukkede kolber. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved analyse af opløst oxygen. Den oxygenmængde, som teststoffet har forbrugt, korrigeres for den oxygenmængde, der er forbrugt i den parallelle inoculumblindprøve, og udtrykkes i procent af ThOD eller COD.

VI.2. BESKRIVELSE AF METODEN

VI.2.1. Apparatur

(a) BOD-kolber med glasprop, f.eks. 250-300 ml

(b) vandbad eller inkuberingsapparat, som kan holde kolberne ved konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i mørke

(c) store glasflasker (2-5 l) til fremstilling af medium og opfyldning af BOD-kolberne

(d) oxygenelektrode og -måler eller udstyr og reagenser til Winkler-titrering.

VI.2.2. Fremstilling af uorganisk medium

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

1 ml af opløsning (a), (b), (c) og (d) fortyndes til 1 liter med vand.

VI.2.3. **Fremstilling af inoculum**

Inoculum tages normalt fra det sekundære afløb fra et spildevandsanlæg eller et laboratorieanlæg, som fortrinsvis modtager husholdningspildevand. En alternativ inoculumkilde er overfladevand. Brug normalt fra en dråbe (0,05 ml) til 5 ml filtrat pr. liter medium. Afprøvninger kan være nødvendige for at klarlægge det optimale volumen for et givet afløb (se I.6.4.2. og I.6.5.).

VI.2.4. **Klargøring af kolberne**

Det uorganiske medium beluftes kraftigt i mindst 20 minutter. En given forsøgsrække udføres med uorganisk medium fra samme batch. Normalt er mediet klar til brug efter henstand i 20 timer ved testtemperaturen. Som kontrol bestemmes koncentrationen af opløst oxygen; værdien skal ligge omkring 9 mg/l ved 20 °C. Al overføring og opfyldning med det luftmættede medium udføres, uden at der dannes bobler, f.eks. med en hævert.

Der klargøres parallelle grupper af BOD-kolber til samtidige forsøg med test- og referencestof. Der samles så mange BOD-kolber, inklusive inoculumblindprøver, at der mindst kan foretages dobbeltbestemmelse af oxygenforbruget med den ønskede hyppighed, f.eks. efter 0, 7, 14, 21 og 28 dage. Det kan være nødvendigt at anvende flere kolber, hvis man vil være sikker på at kunne identificere 10-dages vinduet.

De store kolber fyldes en tredjedel op med fuldt beluftet uorganisk medium. Dernæst tilsættes der så meget stamopløsning af tes- og referencestof til forskellige kolber, at deres slutkoncentration normalt ikke bliver større end 10 mg/l. Til en særskilt kolbe med kontrolmedium tilsættes der ingen kemikalier.

For at være sikker på, at inoculumaktiviteten ikke begrænses, må koncentrationen af opløst oxygen ikke falde til under 0,5 mg/l i BOD-kolberne, hvilket begrænser testkemikaliets koncentration til ca. 2 mg/l. Af tungt nedbrydelige stoffer og stoffer med lavt ThOD kan der dog anvendes 5-10 mg/l. I visse tilfælde tilrådes det at køre parallelle serier med teststof i to forskellige koncentrationer, f.eks. 2 og 5 mg/l. Normalt beregnes ThOD på basis af dannelsen af ammoniumsalte, men hvis der forventes eller vides at ske nitrifikation, beregnes værdien på grundlag af nitratdannelsen ($ThOD_{NO3}$: se bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation korrigeres der for de ændringer i nitrit- og nitratkoncentrationen, der er bestemt ved analyse (se bilag V).

Endnu en serie kolber er påkrævet, hvis teststoffets toksicitet skal undersøges (f.eks. hvis der tidligere er fundet en lav bionedbrydelighedsværdi).

Hertil klargøres der endnu en stor kolbe med beluftet uorganisk medium (ca. en tredjedel fuld) plus teststof og referencestof normalt i samme slutkoncentrationer som i de andre kolber.

Der tilsættes inoculum til kolberne i form af sekundært afløbsvand (fra 1 dråbe (ca. 0,05 ml) til 5 ml pr. liter) eller f.eks. flodvand (se I.6.4.2). Endelig fyldes der op med beluftet uorganisk medium ved hjælp af en slange, der når helt ned til bunden, så der bliver tilstrækkelig omrøring.

VI.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

I en typisk testrække anvendes følgende antal kolber:

mindst 10 med teststof og inoculum (testopslæmning)

mindst 10 kun med inoculum (inoculumblindprøve)

mindst 10 med referencestof og inoculum (procedurekontrol)

og i givet fald 6 kolber med teststof, referencestof og inoculum (toksicitetskontrol). Til sikker identifikation af 10-dages vinduet kræves der dog det dobbelte antal kolber.

VI.2.6. **Gennemførelse af testen**

De fremstillede opløsninger fordeles straks i de pågældende grupper af BOD-kolber, idet de suges op fra den nederste fjerdedel af den passende store kolbe (ikke bunden) med en slange, og således at alle BOD-kolberne fyldes helt. Eventuelle luftbobler fjernes ved en let banken på kolbens side. Starttidskolberne analyseres straks for opløst oxygen enten ved Winklers metode eller med elektrode. Indholdet i kolberne kan opbevares til senere analyse efter Winklers metode, hvis der straks tilsættes mangan(II)sulfat og natriumhydroxid (det første Winkler- reagens). De omhyggeligt tilproppede kolber, hvor oxygenet er fikseret som brunt hydratiseret mangan(III)oxid, opbevares i mørke ved 10-20 °C i højst 24 timer, inden Winkler-testen gøres færdig. De resterende kolber tilproppes, idet man sørger for, at der ikke indesluttes nogen luftbobler, og de inkuberes ved 20 °C i mørke. Parallelt med hver serie skal der være en fuldstændig serie til bestemmelse af inoculumblind-værdien. Under de 28 dages inkubering udtages der med bestemte mellemrum (mindst en gang om ugen) mindst 2 kolber af hver serie til analyse for opløst oxygen.

Med ugentlig prøveudtagning skulle den procentvise fjernelse kunne bedømmes i et 14-dages vindue, mens der ved prøveudtagning hver 3. til 4. dag, hvilket kræver omtrent det dobbelte antal kolber, bliver mulighed for identificering af 10-dages vinduet.

For N-holdige stoffers vedkommende må der korrigeres for oxygenforbrug ved eventuel nitrifikation. Hertil anvendes der en O_2-elektrode til bestemmelse af koncentrationen af opløst oxygen, hvorefter der udtages en prøve fra BOD-kolben til analyse for nitrit og nitrat. Den forbrugte oxygenmængde beregnes på grundlag af forøgelsen i nitrit- og nitratkoncentrationen (se bilag V).

VI.3. DATA OG RAPPORTERING

VI.3.1. Behandling af resultaterne

Først beregnes BOD efter hvert tidsinterval ved at trække oxygentabet (mg O_2 pr. l) i inoculumblindprøven fra oxygentabet i kolben med teststof. Dette korrigerede oxygentab divideres med teststoffets koncentration (mg/l), hvorved den specifikke BOD fremkommer i mg oxygen pr. mg teststof. Den procentvise bionedbrydelighed beregnes ved at dividere den specifikke BOD med den specifikke ThOD (beregnet som anført i bilag II.2) eller COD (bestemt ved analyse, se bilag II.3), dvs.:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststof} - \text{mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven}}{\text{mg teststof i kolben}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ pr. mg teststof.}$$

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2 \text{ pr. mg teststof)}}{\text{ThOD (mg } O_2 \text{ pr. mg teststof)}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2 \text{ pr. mg teststof)}}{\text{COD (mg } O_2 \text{ pr. mg teststof)}} \times 100$$

Det bemærkes, at de to metoder ikke nødvendigvis giver samme resultat; førstnævnte metode foretrækkes.

Der benyttes den ThOD (NH_4 eller NO_3), der svarer til det foreliggende kendskab til nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

VI.3.2. Resultaternes gyldighed

Inoculumblindprøvens oxygentab bør ikke være større end 1,5 mg opløst oxygen pr. liter efter 28 dage. Findes der højere værdier, må forsøgsteknikkerne gennemgås kritisk. Restkoncentrationen af oxygen i testkolberne må

ikke falde til under 0,5 mg/l på noget tidspunkt. Målinger af så lavt oxygenindhold er kun gyldige, hvis den anvendte målemetode for opløst oxygen tillader nøjagtig måling af så lave indhold.

Se også I.5.2.

VI.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VI.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

CLOSED BOTTLE TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

   Navn:

   Stamopløsningens koncentration: ... mg/l

   Begyndelseskoncentration i kolbe: ... mg/l

   ThOD eller COD: ... mg O_2/mg teststof

4. **INOCULUM**

   Kilde:...

   Behandling: ...

   Eventuel forkonditionering: ...

   Koncentrationen i reaktionsblandingen: ... ml/l

5. **DO-BESTEMMELSE**

   Metode: Winkler/elektrode

Kolbeanalyser

Inkuberingstid (dage)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blindprøve (uden teststof)	1	C_1				
	2	C_2				
Gennemsnit	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Teststof	1	a_1				
	2	a_2				
Gennemsnit	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Anmærkning: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne

6. KORREKTION FOR NITRIFIKATION (se bilag V)

Inkuberingstid (dage)	0	n_1	n_2	n_3
(i) Nitratkoncentration (mg N/l)				
(ii) Ændring i nitratkoncentration (mg N/l)	—			
(iii) Oxygenækvivalent (mg/l)	—			
(iv) Nitritkoncentration (mg N/l)				
(v) Ændring i nitritkoncentration (mg N/l)	—			
(vi) Oxygenækvivalent (mg/l)	—			
(iii + vi) Total oxygenækvivalent (mg/l)	—			

7. TAB AF DO: % NEDBRYDNING

	Tab efter n dage (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Kolbe 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Kolbe 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Kolbe 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. af test} \times \text{ThOD for stof}}$				
Kolbe 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. af test} \times \text{ThOD for stof}}$				
$\% D \text{ gnsn.}^{*} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Tag ikke gennemsnittet hvis der er en betydelig forskel mellem replikaterne.

m_{to} = værdi i testkolbe til tid 0

m_{tx} = værdi i testkolbe til tid x

m_{bo} = gennemsnitsblindværdi til tid 0

m_{bx} = gennemsnitsblindværdi til tid x

Der foretages desuden korrektion for nitrifikation som beregnet i punkt 6.

8. BLINDPRØVER FOR TAB AF DO

Oxygenforbrug i blindprøve: $(m_{b0} - m_{b28})$ mg/l. Dette forbrug har betydning for testens gyldighed og må højst være 1,5 mg/l.

DEL VII. MITI-TEST (Metode C.4-F)

VII.1. METODENS PRINCIP

Oxygenoptagelsen i en omrørt opløsning eller opslæmning af teststoffet i uorganisk medium, som er tilsat inoculum i form af særligt dyrkede ikke-tilvænnede mikroorganismer, måles automatisk gennem en periode på 28 dage i et mørklagt lukket respirometer ved 25 ± 1 °C. Den udviklede kuldioxid absorberes i natriumhydroxid. Bionedbrydeligheden udtrykkes som den optagne oxygenmængde (korrigeret for blindprøvens optagelse) i procent af den teoretiske oxygenoptagelse (ThOD). Også den procentvise primære bionedbrydelighed beregnes, nemlig på grundlag af supplerende specifikke kemiske analyser ved inkuberingens begyndelse og slutning og eventuelt ved DOC-analyse.

VII.2. BESKRIVELSE AF METODEN

VII.2.1. Apparatur

a) Automatisk elektrolytisk BOD-meter eller respirometer, normalt med 6 kolber på hver 300 ml og med skåle til CO_2-absorptionsmiddel

b) Lokale med konstant temperatur og/eller vandbad på 25 ± 1 °C eller mindre

c) Membranfiltreringsudstyr (valgfrit)

d) Kulstofanalysator (valgfri).

VII.2.2. Fremstilling af uorganisk medium

Følgende stamopløsninger fremstilles ud fra reagenser af analysekvalitet og vand (I.6.1.):

(a) monokaliumdihydrogenorthophosphat, KH_2PO_4 8,50 g

dikaliummonohydrogenorthophosphat, K_2HPO_4 21,75 g

dinatriummonohydrogenorthophosphat dodecahydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 44,60 g

ammoniumchlorid, NH_4Cl 1,70 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

Opløsningens pH skal være 7,2.

(b) magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 22,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

(c) calciumchlorid, vandfrit, $CaCl_2$ 27,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

(d) jern(III)chlorid hexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ 0,25 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

Der udtages 3 ml af opløsning (a), (b), (c) og (d), som fortyndes til 1 liter.

VII.2.3. Fremstilling af inoculum

Der indsamles friske prøver fra mindst 10 lokaliteter, hovedsagelig områder, hvor der anvendes og udledes forskellige kemikalier. Fra sådanne lokaliteter som spildevandsanlæg, vandløb, søer og havområder indsamles 1-liters prøver af slam, overfladejord, vand, m.v., og det hele blandes grundigt. Materiale, der flyder ovenpå, fjernes, og efter henstand indstilles supernatantens pH til 7 ± 1 med natriumhydroxid og phosphorsyre.

Der benyttes en passende mængde filtrat til at fylde en »fill-and-draw« aktiv slambeholder, og væsken beluftes i ca. $23^1/_2$ time. 30 minutter efter at beluftningen er standset, borthældes ca. $^1/_3$ af det samlede supernatantvolumen, og der tilsættes en lige så stor mængde af en opløsning (med pH 7), der indeholder 0,1 % glucose, 0,1 % pepton og 0,1 % monokaliumorthophosphat, og beluftningen genoptages. Dette gentages hver dag. Slamenheden drives efter god praksis: afløbsvandet skal være klart, temperaturen skal holdes på 25 ± 2 °C, pH skal være 7 ± 1, slam skal bundfældes godt, tilstrækkelig beluftning skal opretholdes for at holde blandingen aerob hele tiden, protozoer skal være til stede og slamaktiviteten skal testes mod referencestoffet mindst hver tredje måned. Slammet må tidligst anvendes som inoculum efter en måneds drift og ikke senere end efter fire måneders drift. Derefter udtages der regelmæssigt prøver fra mindst 10 lokaliteter hver tredje måned.

For at holde det friske og det gamle slam på samme aktivitet, blandes den filtrerede supernatant fra aktivt slam i brug med en lige så stor mængde filtreret supernatant fra en frisk indsamlet blanding fra 10 kilder, og denne væske opdyrkes som ovenfor nævnt. 18-24 timer efter at enheden er fyldt op, kan der udtages slam til brug som inoculum.

VII.2.4. Klargøring af kolber

Der klargøres 6 kolber som følger:

nr. 1: teststof i fortyndingsvand, 100 mg/l

nr. 2, 3 og 4: teststof fortyndet med uorganisk medium til 100 mg/l

nr. 5: referencestof (f.eks. anilin) fortyndet med uorganisk medium til 100 mg/l

nr. 6: rent uorganisk medium

Tungtopløselige teststoffer tilsættes direkte på vægt- eller volumenbasis eller håndteres som beskrevet i bilag III, bortset fra, at der hverken må benyttes opløsningsmidler eller emulgatorer. Der anbringes CO_2-absorptionsmiddel i alle kolber i den særlige skål. pH i kolbe nr. 2, 3 og 4 justeres til 7,0.

VII.2.5. Gennemførelse af testen

Der tilsættes en lille mængde inoculum til kolbe nr. 2, 3 og 4 (testopslæmninger), nr. 5 (aktivitetskontrol) og nr. 6 (inoculumblindprøve), således at koncentrationen af opslæmmet tørstof bliver på 30 mg/l. Der tilsættes ikke inoculum til kolbe nr. 1, der tjener som abiotisk kontrol. Udstyret samles, der kontrolleres for lufttæthed, omrørerne startes, og oxygenoptagelsesmålingen startes i mørke. Temperaturen, omrøringen og den coulometriske oxygenoptagelsesskriver kontrolleres dagligt, og eventuelle farveændringer i kolberne noteres. Oxygenoptagelsen i de 6 kolber aflæses direkte v.h.a. en passende metode, f.eks. på sekskanalsskriveren, som giver en BOD-kurve. Ved inkuberingens afslutning, normalt efter 28 dage, måles pH i kolberne, og koncentrationen af resterende teststof og af eventuelle mellemprodukter og, når der er tale om vandopløselige stoffer, eventuelt DOC-koncentrationen bestemmes (bilag II.4). Der må udvises særlig omhu, når der er tale om flygtige kemikalier. Forventes der nitrifikation, bestemmes om muligt nitrat- og nitritkoncentrationen.

VII.3. DATA OG RAPPORTERING

VII.3.1. Behandling af resultaterne

Teststoffets oxygenforbrug (mg) efter et givet tidsrum, korrigeret for oxygenoptagelsen i inoculumblindprøven efter samme tidsrum, divideres med den anvendte vægtmængde teststof. Herved fremkommer BOD udtrykt som mg oxygen pr. mg teststof, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststoffet} - \text{mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven}}{\text{mg teststof i kolben}}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ pr. mg teststof.}$$

Den procentvise bionedbrydning fremkommer af:

$$\% \text{ bionedbrydning} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2 \text{ pr. mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2 \text{ pr. mg kemikalie)}} \times 100$$

For blandinger beregnes ThOD på samme måde som for enkeltstoffer, nemlig på grundlag af grundstofanalysen. Den ThOD, der benyttes, ($ThOD_{NH4}$ eller $ThOD_{NO3}$) afhænger af, om der slet ikke sker nitrifikation eller der sker fuldstændig nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

Den procentvise primære bionedbrydning beregnes ud fra den mængde af det specifikke (oprindelige) kemikalie, der forsvinder (se I.7,2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Er der forsvundet teststof i kolbe nr. 1, som måler fysisk og kemisk nedbrydning, anføres dette, og teststoffets koncentration (S_b) i denne kolbe efter 28 dage benyttes til beregning af den procentvise bionedbrydning.

Foretages der (valgfrie) bestemmelser af DOC, beregnes den procentvise fuldstændige bionedbrydning ved:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_0 - C_{b0}}\right) \times 100$$

som anført under punkt I.7.1. Er der forsvundet teststof (DOC) i kolbe nr. 1, som måler fysisk og kemisk nedbrydning, benyttes DOC-koncentrationen i denne kolbe til beregning af den procentvise bionedbrydning.

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

VII.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygenforbrug er normalt 20-30 mg O_2/l på 28 dage og bør ikke være større end 60 mg/l. Findes der værdier over 60 mg/l, må data og forsøgsteknikker gennemgås kritisk. Hvis pH ligger uden for intervallet 6-8,5 og teststoffets oxygenforbrug er mindre end 60 %, gentages testen med lavere teststofkoncentration.

Se også I.5.2.

Hvis den procentvise nedbrydning af anilin beregnet ud fra oxygenforbrug ikke er større end 40 % efter 7 dage og 65 % efter 14 dage, anses testen for ugyldig.

VII.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VII.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MITI (I) TEST

1. LABORATORIUM

2. DATO VED TESTENS BEGYNDELSE

3. TESTSTOF

Navn:

Stamopløsningens koncentration: ... mg/l stof

Begyndelseskoncentration i kolbe, C_o: ... mg/l stof

Reaktions blandingens volumen, V: ... ml

ThOD eller COD: ... mg O_2/l

4. INOCULUM

Lokaliteter for prøveudtagning:

1) ... 6) ...
2) ... 7) ...
3) ... 8) ...
4) ... 9) ...
5) ... 10) ...

Koncentration af opslæmmet tørstof i det aktive slam efter akklimatisering med syntetisk spildevand: ... mg/l

Rumfang af aktivt slam pr. liter slutmedium: ... ml

Slamkoncentration i slutmedium: mg/l

5. OXYGENOPTAGELSE: BIONEDBRYDELIGHED

Respirometertype:

			Tid (dage)				
			0	7	14	21	28
O_2 optag. (mg) teststof	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 optag. (mg) blindprøve	b						
Korrigeret O_2 opt. (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BOD per mg teststof	$\frac{(a-b)}{C_oV}$	Kolbe 1					
		Kolbe 2					
		Folbe 3					
% nedbrydning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		gnsn. *					

Anmærkning: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne

* Tag ikke gennemsnittet hvis der er en betydelig forskel mellem replikaterne.

6. **KULSTOFANALYSE** (valgfri)

Kulstofanalysator:

Kolbe	DOC				% DOC fjernet	Gennemsnit
	Målt		Korrigeret			
Vand + teststof	a					
Slam + teststof	b_1		$b_1 - c$			
Slam + teststof	b_2		$b_2 - c$			
Slam + teststof	b_3		$b_3 - c$			
Kontrolblind	c		–			

$$\% \text{ DOC forsvundet: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA FRA SPECIFIK KEMISK ANALYSE**

	Restmængde af teststof ved testens afslutning	% nedbrydning
blindprøve med vand	S_b	
medium med inoculum	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

% nedbrydning beregnes for kolbe a_1, a_2 og a_3.

8. **BEMÆRKNINGER**

En kurve over BOD mod tiden skal vedlægges, hvis den foreligger.

BILAG I

FORKORTELSER OG DEFINITIONER

DO: Opløst oxygen (mg/l) er koncentrationen af opløst oxygen i en vandig prøve.

BOD: Biokemisk oxygenforbrug (g) er den mængde oxygen, som mikroorganismer forbruger under metabolisme af teststoffet; udtrykkes også i g optaget oxygen pr. g teststof (se metode C.5).

COD: Kemisk oxygenforbrug (g) er den mængde oxygen, der forbruges ved oxidation af teststoffet med varm dichromat i sur væske; det er et mål for den tilstedeværende mængde oxiderbart stof; udtrykkes også i g forbrugt oxygen pr. g teststof (se metode C.6).

DOC: Opløst organisk kulstof er den mængde organisk kulstof, der er til stede i opløsning, passerer gennem et 0,45 µm filter, eller forbliver i centrifugatet efter centrifugering ved 40 000 ms^{-2} ($\pm$ 4 000 g) i 15 minutter.

ThOD: Teoretisk oxygenforbrug (mg) er den samlede mængde oxygen, der kræves til fuldstændig oxidation af et kemisk stof; det beregnes på grundlag af bruttoformlen (se bilag II, punkt 2) og udtrykkes også i mg oxygen pr. mg teststof.

$ThCO_2$: Teoretisk kuldioxid (mg) er den mængde kuldioxid, der ifølge beregninger på grundlag af teststoffets kendte eller målte kulstofindhold skulle dannes ved fuldstændig nedbrydning af teststoffet; den udtrykkes også i mg udviklet kuldioxid pr. mg teststof.

TOC: En prøves totale indhold af organisk kulstof er summen af organisk kulstof i opløsning og i opslæmning.

IC: Uorganisk kulstof

TC: En prøves totale kulstofindhold er summen af organisk og uorganisk kulstof.

Primær bionedbrydning:

er en sådan ændring af et stofs kemiske struktur, fremkaldt ad biologisk vej, at stoffet mister sine specifikke egenskaber.

Fuldstændig bionedbrydning (aerob):

er den nedbrydningsgrad, der er nået, når mikroorganismer har opbrugt et teststof fuldstændigt under samtidig dannelse af kuldioxid, vand, uorganiske salte og nye cellebestanddele (biomasse).

Let bionedbrydelig:

kendetegner en arbitrær klasse af kemikalier, der har klaret visse specifikke screeningstests for fuldstændig bionedbrydning; disse tests er så krævende, at sådanne stoffer i vandigt miljø under aerobe forhold hurtigt vil blive fuldstændigt nedbrudt.

Inherent (potentielt) bionedbrydelig:

karakteriserer en klasse af kemikalier, som ved enhver anerkendt bionedbrydelighedstest klart har vist sig at kunne omdannes ved bionedbrydning (primær eller fuldstændig).

Behandlingsmulighed:

er muligheden for at fjerne et stof ved biologisk spildevandsrensning uden at spildevandsrensningsprocessernes normale forløb forstyrres. Generelt er alle let bionedbrydelige, men ikke alle inherent bionedbrydelige, stoffer mulige at behandle. Abiotiske processer kan også spille ind.

Lag-periode:

er det tidsrum, der i en elimineringstest forløber fra inokuleringen, indtil nedbrydningsprocenten er mindst 10 %. Lag-perioden er ofte stærkt varierende og vanskeligt reproducerbar.

Nedbrydningstid:

er tidsrummet mellem lagperiodens afslutning og det tidspunkt, hvor nedbrydningen har nået 90 % af sin maksimale værdi.

10-dages vindue:

er den periode på 10 dage, der begynder, når nedbrydningen er nået op på 10 %.

BILAG II

BEREGNING OG BESTEMMELSE AF PASSENDE HOVEDPARAMETRE

Der vil afhængigt af den valgte metode være behov for forskellige hovedparametre. I dette afsnit beskrives, hvordan disse værdier udledes. Parametrenes anvendelse er beskrevet i de enkelte metoder.

1. **Kulstofindhold**

Kulstofindholdet kan enten beregnes ud fra teststoffets grundstofsammensætning eller bestemmes ved elementaranalyse.

2. **Teoretisk oxygenforbrug (ThOD)**

Det teoretiske oxygenforbrug (ThOD) kan beregnes, hvis grundstofsammensætningen er kendt, og ellers bestemmes ved elementaranalyse. For forbindelsen:

$$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$$

er det uden nitrifikation

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\,(2\,c + 1/2\,(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o)}{MW}\ mg/mg$$

og med nitrifikation

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\,(2\,c + 1/2\,(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o)}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kemisk oxygenforbrug (COD)**

Det kemiske oxygenforbrug (COD) bestemmes efter metode C.6.

4. **Opløst organisk kulstof (DOC)**

Opløst organisk kulstof (DOC) defineres som den organiske kulstofmængde i et kemikalie eller en kemikalieblanding, som i vandig opløsning kan passere gennem et 0,45 µm filter.

Der udtages prøver fra testbeholderne, som straks filtreres gennem filtreringsudstyret, der er forsynet med et passende membranfilter. De første 20 ml af filtratet bortkastes (ved små filtre kan denne mængde reduceres). Der opsamles en mængde på 10 – 20 ml til kulstofanalyse (ved indsprøjtning mindre, afhængigt af den anvendte kulstofanalysator). DOC-koncentrationen bestemmes ved hjælp af en organisk kulstofanalysator, som tillader nøjagtig bestemmelse af en kulstofkoncentration på mindre end 10 % af startkoncentrationen af DOC i testen.

Kan filtrerede prøver ikke analyseres samme arbejdsdag, kan de opbevares i højst 48 timer i køleskab ved 2-4 °C eller i længere tid ved – 18 °C.

Anmærkninger:

Membranfiltre er ofte behandlet med overfladeaktive stoffer, så de bliver mere hydrofile. De kan derfor indeholde op til flere mg opløseligt organisk kulstof, som vil gribe forstyrrende ind i bionedbrydelighedsbestemmelsen. De overfladeaktive stoffer og andre opløselige organiske stoffer fjernes fra filtrene ved kogning i demineraliseret vand i 3 gange 1 time. Derefter kan filtrene opbevares i vand i op til 1 uge. Benyttes der engangsfiltre, må hvert parti kontrolleres for afgivelse af opløseligt organisk kulstof.

På visse typer membranfiltre kan der ske adsorption af teststoffet. Det tilrådes derfor at kontrollere, at teststoffet ikke tilbageholdes på filteret.

Centrifugering ved 40 000 ms^{-2} (4 000 g) i 15 minutter kan træde i stedet for filtrering, når der skal skelnes mellem TOC og DOC. Metoden er ikke pålidelig ved en startkoncentration på < 10 mg DOC pr. l, da enten ikke alle bakterier fjernes eller noget af kulstoffet i bakteriernes cytoplasma genopløses.

BIBLIOGRAFI

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschüß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

BILAG III

VURDERING AF TUNGTOPLØSELIGE STOFFERS BIONEDBRYDELIGHED

Nedenstående forhold kræver særlig opmærksomhed ved test af tungtopløselige stoffers bionedbrydelighed.

Homogene væsker vil sjældent volde problemer ved prøveudtagningen, hvorimod det anbefales at homogenisere faste materialer på passende måde, således at fejl som følge af inhomogenitet undgås. Der må udvises særlig omhu, når der skal udtages en repræsentativ prøve på nogle få mg af blandinger af kemikalier og af stoffer, der indeholder store mængder urenheder.

Under testen kan der anvendes forskellige former for omrøring. Omrøringen skal blot være så kraftig, at kemikaliet holdes dispergeret, og overophedning, stærk skumning og voldsomme forskydningskræfter skal undgås.

Der kan benyttes en emulgator til at frembringe en stabil dispersion af kemikaliet. Emulgatoren må ikke være toksisk for bakterier og må hverken kunne bionedbrydes eller være skumdannende under testbetingelserne.

Der gælder samme kriterier for opløsningsmidler som for emulgatorer.

Det frarådes at benytte faste bærematerialer til faste teststoffer, hvorimod de kan være egnede til olieagtige stoffer.

Når der anvendes hjælpestoffer såsom emulgatorer, opløsningsmidler og bærematerialer, udføres der en blindprøve med hjælpestoffet.

Alle tre respirometertest, CO_2, BOD og MITI, kan benyttes til undersøgelse af tungtopløselige stoffers bionedbrydelighed.

BIBLIOGRAFI

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

BILAG IV

VURDERING AF BIONEDBRYDELIGHEDEN AF KEMISKE STOFFER, DER MISTÆNKES FOR AT VÆRE TOKSISKE FOR INOCULUM

Hvis et kemisk stof, som underkastes en test for let bionedbrydelighed, ikke synes at være bionedbrydeligt, tilrådes det at følge nedenstående fremgangsmåde, hvis der ønskes skelnet mellem hæmning og manglende nedbrydelighed (Reynolds et al., 1987).

Der anvendes samme eller tilsvarende inoculum til toksicitetstest som til bionedbrydningstest.

For at kunne vurdere toksiciteten af kemikalier, der undersøges i tests for let bionedbrydelighed, kan man anvende en af følgende metoder eller en kombination af dem: Hæmning af slammets respirationshastighed (aktiveret slam — respirationshæmningstest — direktiv 88/302/EØF); BOD og/eller vækshæmningstest.

Hvis hæmning som følge af toksicitet skal undgås, anbefales det at benytte teststofkoncentrationer i test for let bionedbrydelighed, som er højst $^1/_{10}$ af de EC_{50}-værdier (eller højst de EC_{20}-værdier), der er fundet ved toksicitetstest. Stoffer, hvis EC_{50} er større end 300 mg/l, vil næppe have toksiske virkninger i tests for let bionedbrydelighed.

En EC_{50} på mindre end 20 mg/l vil sandsynligvis skabe betydelige vanskeligheder for den efterfølgende testning. Testkoncentrationerne skal være lave, hvilket kræver anvendelse af den strenge og følsomme Closed Bottle-test eller af ^{14}C-mærket materiale. Alternativt kan der ved tilvænning af inoculum blive mulighed for at benytte højere teststofkoncentrationer. I sidstnævnte tilfælde mister testen for let bionedbrydelighed dog sin specifikke karakter.

BIBLIOGRAFI

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

BILAG V

KORREKTION AF NITRIFIKATIONENS INTERFERENS PÅ OXYGENOPTAGELSEN

Fejl ved at undlade at tage hensyn til nitrifikation ved vurdering af bionedbrydeligheden af teststoffer, der ikke indeholder N, er minimal (højst 5 %), selv om oxidationen af mediets indhold af ammonium-N svinger vilkårligt fra testprøve til blindprøve. For teststoffer, der indeholder N, kan der imidlertid opstå væsentlige fejl.

Hvis der sker ufuldstændig nitrifikation, kan reaktionsblandingens iagttagne oxygenoptagelse korrigeres for den oxygenmængde, der er medgået til oxidation af ammonium til nitrit og nitrat, hvis ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen under inkuberingen bestemmes under hensyntagen til følgende reaktionsligninger:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 \rightarrow 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 \rightarrow 2\ HNO_3 \quad (2)$$

brutto:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 \rightarrow 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Ud fra ligning (1) bliver oxygenoptagelsen ved oxidation af 28 g nitrogen i form af ammoniumchlorid (NH_4Cl) til nitrit 96 g, dvs. en faktor på 3,43 (96/28). På tilsvarende måde bliver oxygenoptagelsen ved oxidation af 28 g nitrogen til nitrat (3) 128 g, dvs. en faktor på 4,57 (128/28).

Da reaktionerne er *sekventielle*, idet de finder sted p.g.a. hver deres bakteriearter, kan nitritkoncentrationen stige *eller* falde; i sidstnævnte tilfælde vil der blive dannet en ækvivalent mængde nitrat. Derfor bliver oxygenforbruget ved nitratdannelsen 4,57 gange forøgelsen i nitratkoncentrationen, hvorimod den oxygenmængde, der er involveret i nitritdannelsen, er 3,43 gange forøgelsen i nitritkoncentrationen, eller ved et fald i nitritkoncentrationen, et oxygentab på – 3,43 gange koncentrationsfaldet.

Det vil sige, at

O_2-forbrug ved nitratdannelse = 4,57 × N-nitratkoncentrationsforøgelsen (4)

og

O_2-forbrug ved nitritdannelse = 3,43 × N-nitritkoncentrationsforøgelsen (5)

og

O_2-tab ved nitritomdannelse = – 3,43 × N-nitratkoncentrationsfaldet (6)

Derved bliver

O_2-forbrug til nitrifikation = ± 3,43 × N-nitritkoncentrationsændringen + 4,57 × N-nitratkoncentrationsforøgelsen (7)

og dermed

O_2-forbrug til C-oxidation = samlet iagttaget forbrug – forbrug til nitrifikation (8).

Alternativt kan oxygenoptagelsen som følge af nitrifikation som en første tilnærmelse sættes til 4,57 × tilvæksten i oxideret N, hvis kun total oxyderet N bestemmes.

Den korrigerede værdi for oxygenforbruget til C-oxidation sammenlignes dernæst med $ThOD_{NH4}$ beregnet efter bilag II.

C.5. NEDBRYDNING — BIOKEMISK OXYGENFORBRUG

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med metoden er måling af det biokemiske oxygenforbrug (BOD) for faste eller flydende organiske stoffer.

Data, som opnås med denne test, vedrører vandopløselige stoffer; dog kan, i det mindste i princippet, flygtige stoffer samt stoffer med lav vandopløselighed også testes.

Denne metode kan kun anvendes på organiske testmaterialer, der ikke virker hæmmende for bakterier ved den koncentration, som anvendes ved testen. Hvis testmaterialet ikke lader sig opløse ved testkoncentrationen, kan det være nødvendigt at anvende særlige foranstaltninger, såsom ultralyddispersion for at opnå god dispersion af testmaterialet.

Oplysninger om kemikaliets toksicitet kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

BOD defineres som den mængde opløst oxygen, der kræves til biokemisk oxidation af en nærmere angivet mængde opløsning af stoffet under foreskrevne betingelser.

Resultatet udtrykkes som g BOD pr. g undersøgt stof.

1.3. REFERENCESTOFFER

Brug af et egnet referencestof til kontrol af inoculums aktivitet er ønskelig.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

En afmålt mængde stof, opløst eller dispergeret i et egnet og godt gennemluftet medium, podes med mikroorganismer og inkuberes ved konstant kendt temperatur i mørke.

BOD bestemmes som forskellen mellem indholdet af opløst oxygen ved forsøgets begyndelse og ved forsøgets afslutning. Forsøgets varighed skal være mindst fem dage og ikke over 28 dage.

Der udføres parallelt en blindprøve uden indhold af teststof.

1.5. KVALITETSKRITERIER

En BOD-bestemmelse kan ikke betragtes som en gyldig bestemmelse af et stofs bionedbrydelighed, men kun som en screeningtest.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

En foreløbig opløsning eller dispersion af stoffet fremstilles for at opnå en BOD-koncentration, som er forenelig med den anvendte metode. BOD bestemmes derpå efter en hvilken som helst egnet national eller international standardmetode.

2. DATA OG EVALUERING

BOD-indholdet i opløsningen beregnes efter den valgte standardmetode og omregnes til g BOD pr. g stof.

3. RAPPORTERING

Den anvendte metode skal anføres.

Det biokemiske oxygenforbrug skal være gennemsnittet af mindst tre gyldige målinger.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen skal rapporteres, navnlig med hensyn til stoffets egen sammensætning, urenheder, fysiske tilstand og toksiske virkninger, som vil kunne påvirke resultaterne.

Eventuel brug af tilsætningsstof til at hindre biologisk nitrifikation skal rapporteres.

4. LITTERATURHENVISNINGER

Liste over standardiserede metoder, f.eks.

NF T 90 — 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. NEDBRYDNING: KEMISK OXYGENFORBRUG

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at måle det kemiske oxygenforbrug (COD) for faste og flydende organiske stoffer på en vilkårlig standardiseret måde under bestemte laboratoriebetingelser.

Oplysninger om stoffets formel vil være nyttige ved gennemførelse af testen og for fortolkningen af de opnåede resultater (f.eks. halogensalte, organiske jern(II)salte, organiske chlorforbindelser).

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Det kemiske oxygenforbrug er et mål for et stofs evne til at kunne oxideres, og det udtrykkes som den ækvivalente mængde oxygen i det oxiderende reagens, der forbruges af stoffet under bestemte laboratoriebetingelser.

Resultatet udtrykkes som g COD pr. g undersøgt stof.

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kalibrering af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

En afmålt mængde af stoffet, opløst eller dispergeret i vand, oxideres med kaliumdichromat i stærkt svovlsur opløsning med sølvsulfat som katalysator under tilbagesvaling i to timer. Den uforbrugte mængde dichromat bestemmes ved titrering med en standardopløsning af ferroammoniumsulfat.

I tilfælde af chlorholdige stoffer tilsættes mercurisulfat (*) for at nedsætte interferens fra chlorid.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Da metoden har en vis vilkårlig karakter, må COD betragtes som en »oxiderbarhedsindikator«, der er et praktisk mål for indholdet af organisk stof.

Chlorid kan forstyrre målingen; også uorganiske reducerende eller oxiderende stoffer kan forstyrre COD-bestemmelsen.

Visse cykliske forbindelser og mange flygtige stoffer (f.eks. lavere fedtsyrer) oxideres ikke fuldstændigt ved denne metode.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Der fremstilles en foreløbig opløsning eller dispersion af stoffet, således at der opnås en COD-værdi mellem 250 og 600 mg pr. liter.

Bemærkning:

I tilfælde af vanskeligt opløselige og ikke dispergerbare stoffer kan der afvejes en mængde fint pulveriseret eller væskeformigt stof svarende til ca. 5 mg COD, som overføres til forsøgsopstillingen med vand.

Det kemiske oxygenforbrug kan ofte, og især for stoffer med ringe opløselighed, med fordel bestemmes med en variant af metoden, nemlig et lukket system med trykudligning (H. Kelkenberg, 1975). Med denne modifikation kan der ofte med held foretages kvantitativ bestemmelse af forbindelser, der kun vanskeligt kan bestemmes ved konventionelle metoder, f.eks. eddikesyre. Metoden duer dog ikke til pyridin. Forøgelse af kaliumdichromatkoncentrationen til 0,25 N (0,0416 M) som anført i (ref. 1) kan lette den direkte afvejning af 5-10 mg stof, hvilket er en betingelse for COD-bestemmelse på stoffer med ringe vandopløselighed (ref. 2).

I øvrigt bestemmes COD derefter ved hjælp af en egnet national eller international standardmetode.

2. DATA OG EVALUERING

COD-indholdet i forsøgskolben beregnes i henhold til den valgte standardmetode og omregnes til g COD pr. g teststof.

(*) Brugte opløsninger, der indeholder mercurisalte, behandles således, at der ikke spredes kviksølv til miljøet.

3. RAPPORTERING

Den anvendte referencemetode skal anføres.

Det kemiske oxygenforbrug skal være et gennemsnit af mindst tre målinger. Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen af resultaterne skal rapporteres, navnlig med hensyn til stoffets egen sammensætning, urenheder og fysiske tilstand (hvis de kendes), som vil kunne påvirke resultaterne.

Anvendelse af mercurisulfat til formindskelse af interferens fra chlorid skal rapporteres.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) Kelkenberg, H. . Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Liste over standardiserede metoder, f.eks.:

NBN T 91-201: Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494: Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101: Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis: Determination of the chemical oxygen: demand.

DIN 38409-H-41: Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060: Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7. ABIOTISK NEDBRYDNING: HYDROLYSE SOM FUNKTION AF pH

1. METODE

Denne metode er baseret på OECD-testvejledningen (1).

1.1. INDLEDNING

Hydrolyse er en vigtig reaktion, der styrer den abiotiske nedbrydning. Denne reaktion er særlig relevant for stoffer med lav bionedbrydelighed, og den kan have indflydelse på et stofs persistens i miljøet.

De fleste hydrolysereaktioner er af *pseudo*-første orden, og derfor er halveringstiden uafhængig af koncentrationen. Dette betyder, at resultater, der er bestemt ved laboratoriekoncentrationer, normalt kan ekstrapoleres til forholdene i miljøet.

Endvidere foreligger der adskillige eksempler (2) på tilfredsstillende overensstemmelse for flere typer kemiske stoffer mellem resultater bestemt i rent og i naturligt forekommende vand.

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets damptryk.

Denne metode kan kun anvendes på vandopløselige stoffer. Urenheder kan påvirke resultaterne.

Kemiske stoffers hydrolyseegenskaber skal undersøges ved pH-værdier, som normalt findes i miljøet (pH 4-9).

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Hydrolyse er reaktionen mellem et stof RX og vand og kan udtrykkes ved nettoudskiftning af gruppen X med OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Den hastighed, hvormed koncentrationen af RX aftager, er givet ved:

$$\text{hastighed} = k\,[H_2O]\,[RX] \qquad [2]$$

Da vand er til stede i stort overskud i forhold til stoffet, beskrives denne type reaktion almindeligvis som en *pseudo*-første ordens reaktion, hvor den iagttagne hastighedskonstant er givet ved ligningen:

$$k_{obs} = k\,[H_2O] \qquad [3]$$

Denne konstant kan ved et givet pH og en given temperatur (T) bestemmes ud fra udtrykket:

$$k_{obs} = \frac{2{,}303}{t} \cdot \log \frac{c_0}{c_t} \qquad [4]$$

hvor:

t = tiden,

c_0 = koncentrationen af stoffet ved tiden 0,

c_t = koncentrationen af stoffet ved tiden t, og

2,303 = faktoren for omregning mellem naturlige logaritmer og titalslogaritmer.

Koncentrationerne er udtrykt i g pr. l eller mol pr. l.

Konstanten k_{obs} har dimensionen $(\text{tid})^{-1}$.

Halveringstiden $t_{\frac{1}{2}}$ er defineret som den tid, det tager koncentrationen af stoffet at falde 50 %, d.v.s.:

$$c_t = \tfrac{1}{2}\, c_0 \qquad [5]$$

Ved hjælp af ligning [4] og [5] kan det vises, at:

$$t_{\frac{1}{2}} = 0{,}693/k_{obs} \qquad [6]$$

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Følgende stoffer har været anvendt som referencestoffer (1):

Acetylsalicylsyre (aspirin) og

0,0-diethyl-0-(6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinylphosphorthioat) (dimpylate, diazinon).

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Stoffet opløses i vand i lav koncentration ved kendt pH og temperatur.

Faldet i stoffets koncentration som funktion af tiden følges ved hjælp af en egnet analysemetode.

Koncentrationernes logaritmer afbildes mod tiden, og hvis der fremkommer en ret linje, fås den første ordens hastighedskonstant af dens hældning (jf. 2).

Når det ikke er praktisk muligt direkte at bestemme en hastighedskonstant ved en bestemt temperatur, kan man sædvanligvis skønne en værdi for konstanten ved brug af Arrhenius-ligningen, som udtrykker hastighedskonstantens afhængighed af temperaturen. Ud fra en lineær afbildning af logaritmen til hastighedskonstanten, bestemt ved passende temperaturer, mod den reciprokke absolutte temperatur (K) kan der ekstrapoleres til den hastighedskonstant, der ikke kunne bestemmes direkte.

1.5. KVALITETSKRITERIER

I reference (2) er det anført, at hastighedskonstanter for hydrolyse af 13 grupper organiske stoffer kan bestemmes med stor nøjagtighed.

Repeterbarheden afhænger især af, hvor nøje pH og temperaturen kendes, og kan påvirkes af, at der er mikroorganismer til stede, og i særlige tilfælde af koncentrationen af opløst oxygen.

1.6. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.6.1. **Reagenser**

1.6.1.1. *Bufferopløsninger*

Prøven udføres ved tre pH-værdier, nemlig 4,0, 7,0 og 9,0.

Til dette formål fremstilles der bufferopløsninger af analyserene kemikalier og sterilt destilleret eller deioniseret vand. I tillæg 1 er der vist nogle eksempler på buffersystemer.

Buffersystemet kan muligvis influere på hydrolysehastigheden. Hvis der er tegn herpå, anvendes et andet buffersystem. I reference (2) anbefales borat- eller acetatbuffere frem for phosphatbuffere.

Hvis bufferopløsningens pH ikke er kendt ved den temperatur, der benyttes ved testen, skal pH bestemmes med et kalibreret pH-meter ved den valgte temperatur med en nøjagtighed på ± 0,1 pH-enheder.

1.6.1.2. *Testopløsninger*

Stoffet opløses i den valgte buffer i en koncentration på højst 0,01 M, eller den halve mætningskoncentration (den laveste af disse vælges).

Brug af organiske opløsningsmidler, der er blandbare med vand, anbefales kun til stoffer med ringe vandopløselighed.

Opløsningsmidlets mængde bør højst være 1 %, og det må ikke indvirke på hydrolyseprocessen.

1.6.2. **Apparatur**

Der bruges glaskolber med prop, men der må ikke anvendes fedt på slibene.

Hvis stoffet eller buffersystemet er flygtigt, eller hvis testen udføres ved højere temperaturer, foretrækkes forseglede eller membranlukkede glas, og luftmellemrum mellem væskeoverflade og prop bør undgås.

1.6.3. **Analysemetode**

Metoden skal være specifik, således at stoffet kan bestemmes ved testkoncentrationerne, og der kan udmærket benyttes en kombination af egnede analyseteknikker.

Analysemetoden afhænger af stoffets art og skal være tilstrækkelig nøjagtig og følsom til, at et fald på 10 % i forhold til startkoncentrationen kan påvises.

1.6.4. **Testbetingelser**

Testen udføres i et termostatstyret aflukke eller i et bad, hvis temperatur ligger inden for ± 0,5 °C af den valgte temperatur. Temperaturen holdes inden for ± 0,1 °C. Der træffes foranstaltninger til at undgå interferens fra fotolyse.

For stoffer, der let kan oxideres, må opløst oxygen fjernes (f.eks. ved gennembobling med nitrogen eller argon i fem minutter før fremstilling af opløsningen).

1.6.5. **Fremgangsmåde**

1.6.5.1. *Indledende test*

Der udføres for alle stoffer en indledende test ved 50 °C ± 0,5 °C ved tre pH-værdier: 4,0, 7,0 og 9,0. Der foretages tilstrækkelig mange målinger til, at det ved hver pH-værdi og ved 50 °C kan bestemmes, om halveringstiden ($t_{\frac{1}{2}}$) er mindre end 2,4 timer, eller om mindre end 10 % er hydrolyseret efter fem dage. (Disse værdier anslås at svare omtrent til halveringstider på henholdsvis mindre end én dag og mere end ét år under forhold, der er mere repræsentative for miljøet (25 °C).

Hvis den indledende test viser, at 50 % eller mere af stoffet er hydrolyseret på 2,4 timer ved 50 °C, eller at mindre end 10 % er hydrolyseret efter fem dage, ved alle tre pH-værdier (4, 7 og 9), er yderligere test ikke nødvendige.

I andre tilfælde, og ved de pH-værdier, hvor ovennævnte betingelser ikke har været opfyldt, udføres test nr. 1.

1.6.5.2. *Test nr. 1*

Test nr. 1 udføres ved én temperatur, fortrinsvis 50 °C ± 0,5 °C og om muligt under sterile forhold, ved de pH-værdier, hvor den indledende test har vist, at yderligere test er påkrævet.

Der vælges et tilstrækkeligt antal prøver (ikke mindre end fire) til at dække intervallet 20 til 70 % hydrolyse, således at det ved de specificerede pH-værdier kan kontrolleres, at reaktionen er af *pseudo*-første orden.

Reaktionens orden bestemmes ved hver af de pH-værdier, ved hvilke test nr. 1 udføres.

Skøn over hastighedskonstanten ved 25 °C:

Hvorledes der skal gås frem eksperimentelt afhænger af, om man ud fra test nr. 1 kan slutte, at reaktionen er af *pseudo*-første orden eller ikke.

Hvis det ud fra test nr. 1 ikke med sikkerhed kan konkluderes, at reaktionen er af *pseudo*-første orden, må der udføres yderligere forsøg som beskrevet i test nr. 2.

Hvis det ud fra test nr. 1 kan konkluderes med bestemthed, at reaktionen er af *pseudo*-første orden, udføres de følgende forsøg som beskrevet i test nr. 3. (Alternativt kan det under særlige omstændigheder være muligt at beregne hastighedskonstanterne ved 25 °C ud fra de konstanter ved 50 °C, som er beregnet på grundlag af resultaterne af test nr. 1 (jf. 3.2).)

1.6.5.3. *Test nr. 2*

Denne test udføres ved alle de pH-værdier, hvor det ifølge resultaterne af test nr. 1 er påkrævet:

— enten ved én temperatur under 40 °C,

— eller ved to forskellige temperaturer over 50 °C med mindst 10 °C imellem.

For hver pH-værdi og temperatur, hvor test nr. 2 udføres, bestemmes mindst seks passende fordelte datapunkter, således at hydrolysegraden ligger i intervallet 20 til 70 %.

For én pH-værdi og én temperatur udføres en dobbeltbestemmelse. Hvis test nr. 2 udføres ved to temperaturer over 50 °C, foretrækkes det at udføre dobbeltbestemmelsen ved den laveste af de to temperaturer.

For hver pH-værdi og temperatur, hvor test nr. 2 udføres, angives om muligt et grafisk skøn over halveringstiden ($t_{\frac{1}{2}}$).

1.6.5.4. *Test nr. 3*

Denne test udføres ved alle de pH-værdier, hvor det ifølge resultaterne af test nr. 1 er påkrævet:

— enten ved én temperatur under 40 °C,

— eller ved to forskellige temperaturer over 50 °C med mindst 10 °C imellem.

For hver pH-værdi og temperatur, hvor test nr. 3 udføres, bestemmes tre datapunkter, det første ved tiden 0 og det andet og det tredje, når hydrolysegraden er større end 30 %; konstanten k_{obs} og $t_{\frac{1}{2}}$ beregnes.

2. DATA

For reaktionen af *pseudo*-første orden fremkommer værdierne af k_{obs} for hver pH-værdi og temperatur, testen er udført ved, ud fra afbildninger af logaritmen til koncentrationen mod tiden ved hjælp af udtrykket:

$$k_{obs} = - \text{hældning} \times 2{,}303 \qquad [7]$$

Derefter kan $t_{\frac{1}{2}}$ beregnes ifølge ligning [6].

Hvor det er muligt, skønnes en værdi for $k_{25\,°C}$ ved hjælp af Arrhenius-ligningen.

Jf. 3.1 for reaktioner, der ikke er af *pseudo*-første orden.

3. RAPPORTERING

3.1. RAPPORTERING

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— specifikation af stoffet

— alle resultater, der er fremkommet med referencestoffer

— princippet og detaljerne i den anvendte analysemetode

— for hver test: temperatur, pH-værdi, buffersammensætning og en tabel over alle koncentration/tid-datapunkter

— for *pseudo*-første ordens reaktioner værdierne af K_{obs} og $t_{\frac{1}{2}}$ samt beregningsmåden

— for reaktioner, der ikke er af *pseudo*-første orden, afbildninger af logaritmen til koncentrationen mod tiden

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkning af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Det er undertiden muligt at nå frem til acceptable værdier for teststoffers hastighedskonstant (ved 25 °C) ved beregning, forudsat at der for stoffets homologe findes eksperimentelt bestemte aktiveringsenergier, og at det med rimelighed kan antages, at teststoffets aktiveringsenergi er af samme størrelsesorden.

4. LITTERATURHENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) W. Mabey and T. Mill, »Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions«, J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7, (2), 383-415.

Tillæg 1

BUFFERBLANDINGER

A. CLARK AND LUBS

De pH-værdier, som er angivet i disse tabeller, er beregnet ud fra potentialmålinger under brug af Sørensens standardligninger. De faktiske pH-værdier ligger 0,04 enheder højere end de anførte værdier.

Sammensætning	pH
0,1 M kaliumhydrogenphthalat + 0,1 N HCl ved 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml phthalat til 100 ml	3,8
0,1 M kaliumhydrogenphthalat + 0,1 N NaOH ved 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phthalat til 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phthalat til 100 ml	4,2
0,1 M kaliumhydrogenphosphat + 0,1 N NaOH ved 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml	7,2

0,1 M H_3BO_3 i 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH ved 20 °C

16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml	9,2

B. **KOLTHOFF OG VLEESHOUWER**

Sammensætning	pH
0,1 M monokaliumcitrat og 0,1 N NaOH ved 18 °C	
(tilsæt en lille thymolkrystal mod svampevækst)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml	4,2

C. **SØRENSEN**

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Sammensætning		pH			
			Walbum		
ml Borax	ml HCl	Sørensen 18 °C	10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Sammensætning		pH			
			Walbum		
ml Borax	ml NaOH	Sørensen 18 °C	10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12

C. 8

TOKSICITET FOR REGNORME

TEST I SYNTETISK JORD

1. METODE

1.1. **Indledning**

I denne laboratorietest tilsættes teststoffet til syntetisk jord, hvori der anbringes orme i 14 dage. Efter denne periode (og eventuelt efter syv dage) undersøges stoffets dødelige virkning på regnormene. Testen giver en metode til i løbet af relativt kort tid at foretage en screening af kemikaliers virkning på regnorme ved optagelse gennem huden eller føden.

1.2. **Definition og enhed**

LC_{50}: Koncentration af et stof, som kan forventes at forårsage 50 % af testdyrenes død i løbet af testperioden.

1.3. **Referencestof**

Der anvendes regelmæssigt et referencestof til påvisning af, at testsystemets følsomhed ikke har ændret sig signifikant.

Som referencestof anbefales analytisk rent chloracetamid.

1.4. **Testmetodens princip**

Jord er et variabelt medium, så der anvendes en omhyggeligt defineret syntetisk lerjord til denne test. Der holdes voksne regnorme af arten Eisenia foetida (se anmærkningen i tillægget) i en veldefineret syntetisk jord, som er behandlet med forskellige koncentrationer af teststoffet. Beholdernes indhold spredes på en bakke 14 dage (og eventuelt syv dage) efter forsøgets indledning, og der optælles for hver koncentration, hvor mange regnorme der har overlevet.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Testen er beregnet til at være så reproducerbar som muligt med hensyn til testsubstrat og organisme. Dødeligheden hos kontroldyrene må ikke overstige 10 % ved testens afslutning; ellers er testen ugyldig.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Materialer*

1.6.1.1. Testsubstrat

Der anvendes veldefineret syntetisk jord som grundsubstrat.

a) Grundsubstrat (vægtprocent tørstof)
   - 10 % sphagnum (så nær pH 5,5 til 6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt)
   - 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 50 % kaolinit
   - ca. 69 % industrielt kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 0,05 til 0,2 mm). Hvis stoffet ikke er tilstrækkeligt let at opslæmme i vand, holdes 10 g pr. testbeholder tilbage for blanding med teststoffet senere
   - ca. 1 % calciumcarbonat ($CaCO_3$), pulveriseret, kemisk rent, tilsat for at få en pH-værdi på 6,0 ± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består af grundsubstrat, teststof og deioniseret vand.

Vandindholdet svarer til ca. 25 til 42 vægtprocent af grundsubstratets tørstof. Substratets vandindhold bestemmes ved tørring af en prøve til konstant vægt ved 105° C. Hovedkriteriet er, at den syntetiske jord er befugtet så meget, at der ikke er noget stående vand. Blandingen foretages omhyggeligt, således at der bliver en jævn fordeling af teststoffet og substratet. Metoden for tilsætning af teststoffet til substratet skal rapporteres.

c) Kontrolsubstrat

Kontrolsubstratet består af grundsubstrat og vand. Hvis der anvendes et tilsætningsstof, skal et ekstra kontrolsubstrat indeholde samme mængde af tilsætningsstoffet.

1.6.1.2. Testbeholdere

Glasbeholdere med et rumfang på ca. en liter (hensigtsmæssigt tildækket med plastlåg, skåle eller plastfolie med ventilationshuller), fyldt med en mængde vådt test eller kontrolsubstrat svarende til 500 g substrattørstof.

1.6.2. *Testbetingelser*

Beholderne opbevares i klimakamre ved en temperatur på 20 ± 2° C og i konstant lys. Lysstyrken bør være 400 til 800 lux.

Testperioden er på 14 dage, men dødeligheden kan eventuelt vurderes syv dage efter testens indledning.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Testkoncentrationer

Koncentrationerne af teststof udtrykkes som stoffets vægt i forhold til grundsubstratets tørstofvægt (mg/kg).

Forprøve

Det koncentrationsområde, der netop forårsager dødelighed fra 0 til 100 % kan bestemmes ved en forprøve, der giver viden om de koncentrationsintervaller, der skal anvendes ved den endelige test.

Stoffet bør testes i følgende koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 og 0,1 mg/stof/kg testsubstrat (tørstofvægt).

Hvis der skal foretages en fuldstændig endelig test, vil én testgruppe pr. koncentration og én til den ubehandlede kontrolgruppe med hver ti orme være tilstrækkelig til forprøven.

Endelig test

Resultaterne af forprøven anvendes til at vælge mindst fem koncentrationer i en kvotientrække, der går fra 0 til 100 % dødelighed, og hvor den konstante faktor ikke må være over 1,8.

Ved test med disse koncentrationsrækker vil LC_{50}-værdien og dens konfidensgrænser kunne skønnes med størst mulig nøjagtighed.

Ved den endelige test anvendes der mindst fire testgrupper pr. koncentration og fire ubehandlede kontrolgrupper med hver ti orme. Resultaterne af disse gentagne grupper angives som en middelværdi og en standardafvigelse.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50}-intervallet.

Blanding af grundsubstratet og teststoffet

Når det er muligt, tilberedes teststoffet uden anden tilsætning end vand. Umiddelbart før testens indledning blandes en emulsion eller dispersion af teststoffet i deioniseret vand eller andet opløsningsmiddel med grundsubstratet eller sprøjtes jævnt ud over dette med en fin kromatografisprøjte eller lignende.

Hvis teststoffet ikke er opløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform).

Kun midler, der let fordamper, må bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Testsubstratet beluftes inden brug. Den fordampede vandmængde erstattes. Kontrolsubstratet må indeholde eventuelle tilsætningsstoffer i samme mængde.

Hvis teststoffet ikke kan opløses, dispergeres eller emulgeres i organiske opløsningsmidler, blandes en blanding af finsand af formalet kvarts og den til behandling af 500 g tørstofvægt syntetisk jord nødvendige mængde teststof med 490 g tørstofvægt testsubstrat.

For hver testgruppe anbringes en mængde vådt testsubstrat svarende til 500 g tørstofvægt i hver glasbeholder, og ti regnorme, der i 24 timer er blevet tilvænnet i et lignende vådt grundsubstrat og derefter hurtigt afskyllet og afdryppet på filtrerpapir før brugen, anbringes på testsubstratets overflade.

Beholderne tildækkes med perforerede plastlåg, skåle eller folie for at forhindre, at substratet indtørrer, og de opbevares under testbetingelser i 14 dage.

Vurderingerne foretages 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning. Substratet spredes på en plade af glas eller rustfrit stål. Regnormene undersøges, og antallet af overlevende regnorme bestemmes. Regnorme anses for døde, hvis de ikke reagerer på en let, mekanisk påvirkning af forenden.

I tilfælde af at undersøgelsen foretages efter syv dage, fyldes substratet atter i beholderen, og de overlevende regnorme genanbringes på den samme testsubstratoverflade.

1.6.4. *Testorganismer*

Testorganismerne bør være voksne Eisenia foetida (se anmærkningen i tillægget) (mindst to måneder gamle med bælte) af en vægt (våd) på 300 til 600 mg. (Med hensyn til opdrætningsmetode henvises til tillægget).

2. DATA

2.1. Behandling og vurdering af resultaterne

De anvendte teststofkoncentrationer rapporteres med henvisning til den procentvise dødelighed for hver koncentration.

Når de opnåede data er dækkende, kan LC_{50} og dens konfidensgrænser ($p = 0,05$) bestemmes ved brug af standardmetoder (Litchfield and Wilcoxon, 1949, eller tilsvarende metode). LC_{50} angives som mg teststof pr. kg testsubstrat (tørstofvægt).

I de tilfælde, hvor koncentrationskurvens hældning er for stejl til, at LC_{50} kan beregnes, er en grafisk bestemmelse af denne værdi tilstrækkelig.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for LC_{50}-intervallet.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med ovenstående kvalitetskriterier

— angivelse af den foretagne test (forprøve og/eller endelig test)

— nøje beskrivelse af testbetingelserne eller angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med metoden; eventuelle afvigelser skal rapporteres

— nøje beskrivelse af, hvorledes teststoffet er blevet iblandet i grundsubstratet

— oplysninger om testorganismer (art, alder, gennemsnitsvægt samt minimums- og maksimumsvægt, betingelserne for avl og opdrætning samt leverandør)

— angivelse af den anvendte metode til bestemmelse af LC_{50}

— testresultaterne, herunder alle anvendte data

— beskrivelse af observerede symptomer eller adfærdsændringer hos testorganismerne

— dødelighed i kontrolgrupperne

— LC_{50} eller højeste testkoncentration uden dødelighed og laveste testkoncentration med en dødelighed på 100 % 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning.

— afbildning af koncentrations-responskurven

— resultater, der er opnået med referencestoffet enten i forbindelse med den pågældende test eller ved tidligere kvalitetskontrolundersøgelser.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 207, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, 1977. *Biology of Earthworms*. London: Chapman and Hall, 331 pp.

(3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon J., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 99—113.

(5) EEC 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Tillæg

Avl og opdrætning af ormene før test

Med henblik på avl anbringes 30 til 50 voksne orme i en avlekasse med frisk substrat og fjernes efter 14 dage. Disse dyr kan bruges til avl af senere grupper. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne (under de foreskrevne betingelser efter to til tre måneders forløb).

Avls- og opdrætningsbetingelser

Klimakammer:	temperatur 20 ± 2° C, helst med konstant lys (lysintensitet 400 til 800 lux).
Avlekasser:	Egnede lave beholdere med et rumfang på 10 til 20 l.
Substrat:	Eisenia foetida kan opdrættes i forskellige dyreekskrementer. Som avlsmedium kan anbefales en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Substratet må have en pH-værdi på ca. 6 til 7 (justeret med calciumcarbonat) og lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration).
	Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt.
	Andre egnede fremgangsmåder ud over ovennævnte metode kan benyttes.

Anmærkning: Der findes to racer af Eisenia foetida, som nogle systematikere har klassificeret som arter (Bouche, 1972). De er morfologisk set omtrent ens, men den ene, Eisenia foetida foetida, har typisk tværgående striber på leddene, hvad den anden, Eisenia foetida andrei, ikke har, og dennes farve er rødbroget. Så vidt muligt bør Eisenia foetida andrei anvendes. Andre arter kan anvendes, hvis den fornødne metodik er til rådighed.

C. 9

BIOLOGISK NEDBRYDNING

ZAHN-WELLENS TEST

1. METODE

1.1. Indledning

Metoden har til formål at vurdere vandopløselige ikke flygtige organiske stoffers potentielle fuldstændige bionedbrydelighed, når de skal udsættes for forholdsvis høje koncentrationer af mikroorganismer under en statisk test.

Der kan forekomme fysisk/kemisk adsorption på de opslæmmede artikler, og der må tages hensyn hertil, når resultaterne fortolkes (jf. 3.2).

De stoffer, der skal undersøges, anvendes i koncentrationer svarende til DOC-værdier i området 50 til 400 mg/l eller COD-vædier i området 100 til 1 000 mg/l (DOC = opløst organisk kulstof; COM = kemisk iltforbrug). Disse forholdsvis høje koncentrationer har den fordel, at de i analytisk henseende er pålidelige. Forbindelser med toksiske egenskaber kan hæmme eller hindre nedbrydningsprocessen.

Ved denne metode anvendes måling af koncentrationer af opløst organisk kulstof eller af det kemiske iltforbrug til bedømmelse af teststoffets fuldstændige biologiske nedbrydning.

Samtidig anvendelse af en specifik analysemetode kan muliggøre vurdering af stoffets primære biologiske nedbrydning (dvs. den oprindelige kemiske forbindelses forsvinden).

Metoden finder kun anvendelse på de organiske teststoffer, som ved koncentrationen under testen:

— er opløselige i vand under forsøgsbetingelserne

— har forsvindende lavt damptryk under forsøgsbetingelserne

— ikke hæmmer bakterier

— kun adsorberes i testsystemet i begrænset omfang

— ikke forsvinder fra testopløsningen som følge af skumning.

Oplysninger om mængdeforholdet mellem teststoffets hovedbestanddele vil være til nytte ved fortolkning af resultaterne, især hvis disse er lave eller usikre.

Ved fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer er det ønskeligt at have oplysninger om stoffets giftvirkning over for mikroorganismer.

1.2. Definitioner og enheder

Nedbrydningsgraden ved testens afslutning anføres således: Biologisk nedbrydelighed i Zahn – Wellens Test:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

hvor:

D_T = biologisk nedbrydning (%) ved tidspunktet T,

C_A = DOC (eller COD)-værdier i forsøgsblandingen, målt tre timer efter igangsætning af testen (mg/l). (DOC = Opløst organisk kulstof, COD = kemisk iltforbrug)

C_T = DOC- eller COD-værdier i forsøgsblandingen ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l),

C_B = DOC- eller COD-værdi for blindprøven ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l),

C_{BA} = DOC- eller COD-værdi for blindprøven, målt 3 timer efter igangsætning af testen (mg/l).

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent.

Den procentvise nedbrydning er angivet som den procentvise DOC- (eller COD-) fjernelse af teststoffet.

Forskellen mellem den værdi, der er målt efter tre timer, og den beregnede, eller helst målte, startværdi kan give nyttige oplysninger om stoffets eliminering (jf. 3.2 »Fortolkning af resultater«).

1.3. Referencestoffer

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelse af nye stoffer; der kan dog endnu ikke anbefales bestemte referencestoffer.

1.4. Testmetodens princip

Aktiveret slam, uorganiske næringsstoffer og teststoffet, der er den eneste kulstofkilde i vandig opløsning, anbringes sammen i en glasbeholder på 1 til 4 liter, som er forsynet med omrøring og beluftning. Blandingen omrøres og beluftes ved 20 til 25° C under indirekte belysning eller mørke i op til 28 dage. Nedbrydningsprocessen følges ved bestemmelse af DOC- (eller COD-) værdier i den filtrerede opløsning én gang dagligt eller regelmæssigt med et andet passende mellemrum. Forholdet mellem den eliminerede DOC (eller COD) efter hvert tidsrum og værdien tre timer efter starten udtrykkes som procentvis biologisk nedbrydning og er et mål for nedbrydningsgraden på dette tidspunkt. Resultatet afbildes mod tiden, hvorved kurven over biologisk nedbrydning fremkommer.

Hvis der anvendes en specifik analysemetode, kan ændringer i det oprindelige stofs koncentration som følge af biologisk nedbrydning måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. Kvalitetskriterier

Det er ved ringtest godtgjort, at denne metodes reproducerbarhed er tilfredsstillende.

Metodens følsomhed afhænger hovedsagelig af blindprøvens variationer og i mindre grad af nøjagtigheden ved bestemmelsen af opløst organisk kulstof og teststofkoncentrationen i væsken.

1.6. **Beskrivelse af fremgangsmåden**

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. Reagenser

vand: drikkevand med mindre end 5 mg organisk kulstof pr. liter. Koncentrationen af calcium- og magnesiumioner må ikke overstige 2,7 mmol/l tilsammen; i modsat fald må der fortyndes passende med deioniseret eller destilleret vand

svovlsyre, analyseren (A.R.):	50 g/l
natriumhydroxidopløsning, A.R.:	40 g/l
opløsning af uorganiske næringsstoffer: i 1 l deioniseret vand opløses:	
Ammoniumchlorid, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
Natriumdihydrogenphosphat, $NaH_2PO_4 . 2H_2O$, A.R.:	33,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g
Dikaliummonohydrogenphosphat, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g

Blandingen fungerer dels som næringsstofkilde, dels som buffersystem.

1.6.1.2. Apparatur

glasbeholdere på 1 til 4 (f.eks, cylindriske beholdere)

omrører med rørehoved af glas eller metal på en passende aksel (Omrøreren bør rotere 5 til 10 cm over beholderens bund). Der kan i stedet anvendes en magnetomrører med en 7 til 10 cm lang magnetpind

glasrør med indvendig diameter på 2 til 4 mm til beluftning. Rørets åbning bør befinde sig ca. 1 cm over beholderens bund

centrifuge (ca. 3 550 g)

pH-meter

apparat til måling af opløst ilt

papirfiltre

apparatur til membranfiltrering

membranfiltre med porestørrelse 0,45 µm. Membranfiltre er kun egnede, hvis der er vished for, at de hverken afgiver kulstoff eller absorberer stoffet under filtreringen

analyseudstyr til bestemmelse af indholdet af organisk kulstof og det kemiske iltforbrug.

1.6.1.3. Tilberedning af inoculum

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg vaskes (flere gange) med vand (jf. ovenfor) ved centrifugering eller dekantering.

Det aktiverede slam skal være i passende stand. Sådant slam kan fås fra et velfungerende anlæg til spildevandsrensning. For at få så mange forskellige bakteriestammer som muligt kan det være bedre at blande inocula fra forskellige kilder (f.eks. forskellige rensningsanlæg, jordekstrakter, flodvand osv.).

Det aktiverede slams aktivitet kontrolleres, jf. »egnethedskontrol«.

1.6.1.4. Fremstilling af testopløsningerne

Til testbeholderen sættes 500 ml vand, 2,5 ml opløsning af uorganiske næringsstoffer pr. liter samt en mængde aktiveret slam, der svarer til 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter færdigblanding. Der tilsættes en så stor mængde stamopløsning af teststoffer, at den færdige blanding får en DOC-koncentration på 50 til 400 mg/l. Det tilsvarende COD-interval er 100 til 1 000 mg/l. Der fyldes op til i alt 1 til 4 l med vand. Valg af det samlede volumen afhænger af det antal prøver, der skal udtages til DOC- eller COD-bestemmelser, og det nødvendige analysevolumen.

Normalt kan et volumen på 2 l betragtes som tilstrækkeligt. Mindst én kontrolbeholder (blindprøve) sættes i gang samtidig med hver testserie; den indeholder kun aktiveret slam og opløsning af uorganiske næringsstoffer fortyndet med vand til samme totalvolumen som i testbeholderne.

1.6.2. *Testens gennemførelse*

Testbeholderne omrøres med magnetomrørere eller propelomrørere under indirekte belysning eller i mørke ved 20 til 25° C. Beluftning sker med komprimeret luft, der om nødvendigt renses med et vatfilter og en vaskeflaske. Det må påses, at slammet ikke bundfælder, og at iltkoncentrationen ikke falder til under 2 mg/l.

pH-værdien kontrolleres regelmæssigt (f.eks. dagligt) og indstilles om nødvendigt til pH 7 til 8.

Lige før prøveudtagningen kompenseres der for tab ved fordampning ved tilsætning af deioniseret eller distilleret vand. Det kan f.eks. anbefales at afmærke væskehøjden i beholderen før testen startes. Der sættes nye mærker efter hver prøveudtagning (uden beluftning og omrøring). De første-prøver udtages altid tre timer efter testens start, således at det kan konstateres, om testmaterialet adsorberes på det aktiverede slam.

Elimineringen af testmaterialet følges ved DOC- eller COD-bestemmelser dagligt eller regelmæssigt med et andet interval. Prøverne fra testbeholderen og blindforsøget filtreres gennem et omhyggeligt vasket papirfilter. De første 5 ml filtrat bortkastes. Slam, der er vanskeligt at filtrere, kan fjernes ved først at centrifugere i ti min. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC og COD. Testens løber i op til 28 dage.

NB: Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter. Membranfiltrene må hverken afgive eller adsorbere organisk materiale.

Egnethedskontrol af det aktiverede slam

I hver testserie bør indgå en beholder, der indeholder et kendt stof, således at man kan kontrollere egnetheden af det aktiverede slam. Til dette formål er diethylenglycol fundet egnet.

Adaptation

Hvis der foretages analyser med forholdsvis korte mellemrum (f.eks. dagligt), vil adaptation klart fremgå af nedbrydningskurven (jf. figur 2). Testen bør derfor ikke sættes i gang umiddelbart før weekenden.

Hvis der forekommer adaptation ved slutningen af perioden, kan testen fortsættes, indtil nedbrydningen er afsluttet.

NB: Hvis der er behov for større viden om det adapterede slams opførsel, udsættes det samme aktiverede slam endnu engang for det samme testmateriale efter følgende fremgangsmåde:

Omrøringen og beluftningen standses, og man lader det aktiverede slam bundfælde sig. Den ovenstående væske fjernes, der fyldes op til 2 l med vand og omrøres i 15 minutter, og blandingen henstår til ny bundfældning. Efter fjernelse af den ovenstående væske anvendes det tilbageblevne slam til gentagelse af testen med det samme materiale som under punkt 1.6.1.4 og 1.6.2.

Det aktiverede slam kan isoleres ved centrifugering i stedet for bundfældning.

Det adapterede slam kan eventuelt blandes med frisk slam, så man når op på i alt 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter.

Analyse

Normalt filtreres prøver gennem et omhyggeligt vasket papirfilter (til vask anvendes deioniseret vand).

Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter (0,45 µm).

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i prøvefiltraterne (de første 5 ml bortkastes) med TOC-instrumentet. Hvis filtratet ikke kan analyseres samme dag, skal det opbevares i køleskab til næste dag. Længere tids opbevaring kan ikke anbefales.

COD-koncentrationen bestemmes i prøvefiltraterne med et COD-analyseudstyr efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i reference 2 nedenfor.

2. DATA OG VURDERING

Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC- og COD-koncentrationerne i prøverne ifølge 1.6.2. Nedbrydningen ved tidspunktet T beregnes med den formel (med definitioner), der anført under 1.2.

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent. Den nedbrydning, der opnås ved slutningen af testen, anføres som »den biologiske nedbrydelighed ved Zahn-Wellens test«.

NB: Hvis der opnås fuldstændig nedbrydning før testperioden er udløbet og dette resultat bekræftes ved endnu en analyse den følgende dag, kan testen afsluttes.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stoffets begyndelseskoncentration

— alle andre oplysninger og forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, et eventuelt referencestof og blindforsøget

— koncentrationen efter tre timer

— kurve over biologisk nedbrydning med forklaring

— hvornår og hvor prøveorganismerne er udtaget, adaptionsgrad, anvendt koncentration osv.

— fyldestgørende begrundelse for alle afvigelser fra fremgangsmåden.

3.2. Fortolkning af resultater

Gradvis fjernelse af DOC (COD) i løbet af dage eller uger viser, at teststoffet nedbrydes biologisk.

Fysisk/kemisk adsorbtion kan dog i visse tilfælde spille en vis rolle, og et tegn herpå er, at der inden for de første tre timer sker fuldstændig eller delvis fjernelse, og at forskellen mellem supernatant væsken fra kontrolforsøget og prøven bliver liggende på et uventet lavt niveau.

Det er nødvendigt at foretage yderligere testning, hvis der skal skelnes mellem biologisk nedbrydning (eller delvis biologisk nedbrydning) og adsorption.

Dette kan gøres på flere måder, mest troværdigt ved at anvende supernatant væsken som inoculum i en basis sat test (helst en respirometrisk test).

Teststoffer, der giver høj fjernelse af DOC (COD), som ikke skyldes adsorption, ved denne test, bør betragtes som potentielt biologisk nedbrydelige. Delvis fjernelse, som ikke skyldes adsorption, betyder, at kemikaliet i hvert fald i et vist omfang nedbrydes biologisk.

Ringe eller ingen fjernelse af DOC (COD) kan skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismerne; dette kan undertiden også vise sig ved, at slammet opløses og forsvinder, hvorved supernatant væsken bliver uklar. Testen bør gentages med en lavere koncentration at teststoff.

Anvendelse af en stofspecifik analysemetode eller ^{14}C-mærket teststof kan give større følsomhed. Hvis der anvendes ^{14}C-mærket teststof, vil påvisning af $^{14}CO_2$ bekræfte, at der er tale om biologisk nedbrydning.

Dersom resultaterne anføres som primær biologisk nedbrydning, bør der om muligt anføres en forklaring på den kemiske strukturændring, som fører til, at analyseresultaterne for det oprindelige teststof falder.

Valget af analysemetode skal underbygges, og analyseresultaterne for blindprøven skal anføres.

4. RFERENCER

(1) OECD, Paris, 1981 *Test Guideline 302 B*. Decision of the Council C(81) 30 Final

(2) Bilag V C.9 Nedbrydning: Kemisk iltforbrug. Kommissionens direktiv 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende*, nr. L 251 af 19. 9. 1984.

C. 10

BIOLOGISK NEDBRYDNING

AKTIVERET SLAM — SIMULATIONSTEST

1. METODE

1.1. Inledning

1.1.1. *Generelle bemærkninger*

Metoden er kun anvendelig for organiske teststoffer, der ved den benyttede testkoncentration:

— er opløselige i vand i det omfang, det er nødvendigt for tilberedning af testopløsningerne

— har et ubetydeligt damptryk under testbetingelserne

— ikke er hæmmende for bakterier.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedbestanddele vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, især i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplsysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismerne kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og ved valget af egnede testkoncentrationer.

1.1.2. *Bestemmelse af fuldstændig bionedbrydelighed (DOC/COD-analyse)*

Formålet med metoden er at bestemme den fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af fjernelsen af stoffet og eventuelle metabolitter i en aktivslamanlægsmodel ved en koncentration svarende til 12 mg DOC/l (eller ca. 40 mg COD/l); 20 mg DOC/l synes at være optimal. (DOC = dissolved organic carbon, dvs. opløst organisk kulstof; COD = chemical oxygen demand, dvs. kemisk oxygenforbrug).

Teststoffets indhold af organisk kulstof (eller dets kemiske oxygenforbrug) skal fastlægges.

1.1.3. *Bestemmelse af primær bionedbrydelighed (specifik analyse)*

Formålet med metoden er at bestemme den primære bionedbrydelighed af et stof i en aktivslamanlægsmodel ved en koncentration på ca. 20 mg/l ved anvendelse af en specifik analysemetode (der kan benyttes lavere eller højere koncentration, hvis analysemetoden og toksicitetshensyn tillader dette). Herved kan stoffets primære bionedbrydelighed bedømmes (dvs. forsvinden af den oprindelige kemiske forbindelse).

Formålet med denne metode er *ikke* at bestemme teststoffets mineralisering.

Der må foreligge en passende analysemetode til bestemmelse af teststoffet.

1.2. Definitioner og enheder

1.2.1. *DOC/COD-analyse*

Nedbrydningen er defineret som den del af teststoffet, der fjernes, efter følgende formel:

$$DR = \frac{T - (E - E_O)}{T} \times 100\% \qquad [1\ a)]$$

hvor:

DR = procent DOC (eller COD) fjernet i den givne middelopholdstid med hensyn til teststoffet

T = teststofkoncentrationen i indløbet i mg DOC/l (eller mg COD/l)

E = DOC-koncentration (eller COD-koncentration) i testenhedens udløb i mg DOC/l (eller mg COD/l)

E_O = DOC-koncentration (eller COD-koncentration) i blindprøveenhedens udløb i mg DOC/l (eller COD/l).

Nedbrydningen angives som den procentdel DOC (eller COD), der fjernes i en given retentionstid med hensyn til teststoffet.

1.2.2. *Specifik analyse*

Den procentdel teststof, der elimineres fra den vandige fase (R_w) i den givne middelopholdstid, fremgår af følgende formel:

$$R_w = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\% \qquad [1\,b)]$$

hvor:

C_I = stofkoncentrationen i testenhedens indløb (mg stof/l, bestemt ved specifiek analyse)

C_O = stofkoncentrationen i testenhedens udløb (mg stof/l, bestemt ved specifiek analyse).

1.3. **Referencestoffer**

I nogle tilfælde, hvor et nyt stof undersøges, kan referencestoffer være nyttige; der kan endnu ikke anbefales specifikke referencestoffer.

1.4. **Testmetodens princip**

Til bestemmelse af den endelige bionedbrydelighed benyttes der parallelt to aktiv slam pilotenheder (OECD »Confirmatory testenheder« eller »Porous pot-enheder«). Teststoffet tilsættes til den ene enheds indløb (syntetisk spildevand eller husholdnings-spildevand), medens den anden enhed kun tilføres spildevand. Til bestemmelse af primær bionedbrydning med specifik analyse i indløb og udløb benyttes der kun én enhed.

DOC-koncentrationerne (eller COD-koncentrationerne) måles i udløbene, eller stofkoncentrationerne bestemmes ved specifik analyse.

DOC, kom skyldes teststoffet, måles ikke, men angives blot.

Når der foretages DOC-målinger (eller COD-målinger), antages forskellene mellem test- og kontroludløbenes gennemsnitkoncentrationer at skyldes ikke-nedbrudt teststof.

Når der foretages specifikke analyser, kan ændringen i stamforbindelsens koncentration måles (primær bionedbrydning).

Der kan arbjedes med enhederne efter »koblingsmetoden«, hvor der foretages transinokulering.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Stoffets startkoncentration afhænger af, hvilken type analyse der foretages og dens begrænsniger.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. Apparatur

Der kræves to enheder af samme type, undtagen når der foretages specifikke analyser. Der er to typer, der kan benyttes:

OECD Confirmatory test:

Udstyret (tillæg I) består af holdetank (A) til syntetisk spildevand, doseringspumpe (B), luftningstank (C), separator (sedimenteringstank) (D), slampumpe (E) til recirkulering af aktiveret slam samt tank (F) til opsamling af det behandlede spildevand.

Tank (A) og (F) skal være af glas eller egnet plast og skal mindst kunne rumme 24 l. Pumpen (B) skal give et konstant flow af syntetisk spildevand til luftningstanken; ethvert egnet system kan benyttes, forudsat at indløbsflow og koncentration er sikret.

Normalt er separatorens højde (D) indstillet således, at luftningstanken indeholder 3 l blandet væske. En sintret luftningsklods (G) er ophængt i tank (C) over keglens spids. Den luftmængde, der blæses gennem luftningstanken, kan kontrolleres ved hjælp af et flowmeter.

Slampumpen (E) er indstillet således, at de aktiverede slam fra separatoren kontinuerligt og regelmæssigt recirkuleres til luftningstanken (C).

Porous pot:

Den porøse krukke laves af porøs polyethylenplade (2 µm tyk, maksimal porestørrelse 95 mm), der formes til cylindre med en diameter på 14 cm og en konisk bund, der danner en vinkel på 45° med siderne (figur 1 og 2 i tillæg II). Den porøse krukke anbringes i en uigennemtrængelig beholder af egnet plastic med en diameter på 15 cm og et udtag i 17,2 cm højde på den cylindriske del, som bestemmer, hvor meget krukken kan rumme (3 l). Der er en stiv støttering af egnet-plast omkring den indre beholders øverste kant, således at der er 0,5 cm plads til udløbsvand mellem den indre og den ydre beholder.

De porøse krukker kan opstilles på bunden af et termostatstyret vandbad. Den indre beholder tilføres luft i bunden, hvorpå der er anbragt egnede luftningsklodser.

Beholder (A) og (E) skal være af glas eller egnet plast og mindst kunne rumme 24 l. Pumpen (B) skal give et konstant flow af syntetisk spildevand til luftningstanken; ethvert egnet system kan benyttes, forudsat at indløbsflow og koncentration er sikret.

Der er behov for ekstra indre porøse krukker til erstatning af krukker, der måtte blive tilstoppet; tilstoppede krukker renses ved 24 timers neddypning i en hypochloritopløsning efterfulgt af grundig afskylning i ledningsvand.

1.6.1.2. Filtrering

Membranfiltreringsapparatur og membranfiltre med en porestørrelse på 0,45 µm. Membranfiltre er egnede, hvis det sikres, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer teststoffet under filtreringen.

1.6.1.3. Spildevand

Der kan anvendes enten syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand.

Eksempel på syntetisk spildevand pr. liter ledningsvand opløses:

pepton:	160 mg
kødekstrakt:	110 mg
urea:	30 mg
NaCl:	7 mg
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg
K_2HPO_4:	28 mg.

Husholdningsspildevand:

Husholdningsspildevandet indsamles frisk hver dag fra overløbet fra primærsedimenteringsranken i et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

1.6.1.4. Stamopløsning af teststof

Der fremstilles en opløsning af teststoffet (f.eks. 1 %) for tilsætning til testenheden. Stofkoncentrationen skal bestemmes, så det vides, hvilken mængde, der skal tilsættes spildevandet eller direkte i enheden via en anden pumpe for at give den krævede testkoncentration.

1.6.1.5. Inokulum

NB: Hvis der anvendes husholdningsspildevand, tjener det ikke noget formål at anvende et inokulum med lav bakteriekoncentration, men der kan bruges aktiveret slam.

Der kan anvendes forskellige former for inokulum.

Her er tre eksempler på et egnet inokulum:

a) Inokulum fra sekundært spildevand

Inokulum laves af sekundært spildevand af god kvalitet fra et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Prøven skal holdes under aerobe forhold indtil brugen. Som forberedelse af inokulum filtreres prøven gennem et groft filter, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes under aerobe forhold indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget. Der skal bruges mindst 3 ml til inokulering.

b) Blandet inokulum

Inokulum fra sekundært spildevand se beskrivelsen ovenfor.

Inokulum fra jord:

100 g havejord (fertil, ikke steril) opslæmmes i 1 000 ml chlorfrit drikkevand (jord med et ekstremt højt indhold af ler, sand eller humus er ikke egnet). Efter omrøring henstår suspensionen i 30 minutter for sedimentering. Supernatanten filtreres gennem et groft filtrerpapir, idet de første 200 ml bortkastes. Beluftning af filtratet begyndes straks og fortsættes indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget.

Inokulum fra overfladevand:

Der tages endnu en del til inokulum fra et mesosaprobt overfladevand. Prøven filtreres gennem et groft filtrepapir, idet de første 200 ml bortkastes. Filtratet holdes under aerobe forhold indtil brugen. Inokulum skal anvendes samme dag, som prøven er taget.

Lige dele af de tre inokulumprøver blandes godt sammen, og det endelige inokulum tages fra denne blanding. Der skal bruges mindst 3 ml til inokulering.

c) Inokulum af aktiveret slam

Der kan som inokulum bruges en mængde (højst 3 l) aktiveret slam (indhold af suspenderede faste bestanddele på op til 2,5 g/l) udtaget fra luftningstanken i et anlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

1.6.2. *Fremgangsmåde*

Testen foretages ved stuetemperatur; temperaturen skal være mellem 18 og 25° C.

Hvis det er hensigtsmæssigt, kan testen foretages ved en lavere temperatur (ned til 10° C): hvis stoffet nedbrydes, kræves der normalt ikke noget yderligere. Hvis stoffet imidlertid ikke nedbrydes, må testen foretages ved en konstant temperatur på mellem 18 og 25° C.

1.6.2.1. Indkøringsperiode: slamdannelse/stabilisering af enhederne

Slamdannelses-/stabiliseringsperioden er den periode, hvori koncentrationen af de suspenderede faste bestanddele af det aktiverede slam og enhedernes ydeevne bliver stationær under de anvendte driftsbetingelser.

Indkøringsperioden er den periode, der går fra det tidspunkt, hvor teststoffet første gang tilsættes, indtil det tidspunkt, hvor dets fjernelse har nået et plateau (relativt konstant værdi). Denne periode må højst være på seks uger;

Vurderingsperioden er en tre-ugersperiode, tre uger fra det tidspunkt, hvor teststoffets fjernelse når en relativt konstant og sædvangligvis høj værdi. For stoffer, der viser ringe eller ingen nedbrydning i de første seks uger, regnes vurderingsperioden for de følgende tre uger.

Man indleder med at fylde den eller de enheder, der er nødvendige til én test, med inokulum blandet med tilløb.

Beluftningen (og luftpumpen (E), hvis der er tale om OECD Confirmatory test-enheder) og doseringspumpen (B) sættes derefter i gang.

Tilløb uden teststof skal passere gennem luftningstanken (C) med en hastighed på enten 1 l i timen eller 0,5 l i timen; det giver en middelopholdstid på enten tre eller seks timer.

Beluftningshastigheden reguleres, således at tankens (C) indhold konstant holdes i suspension, medens indholdet af opløst ilt er mindst 2 mg/l.

Man må med egnede midler forhindre skumdannelse. Der må ikke anvendes skumdæmpende midler, der hæmmer det aktiverede slam.

Det slam, der har samlet sig rundt om toppen af luftningstanken (C) (og for OECD Confirmatory test-enheders vedkommende i bunden af sedimenteringstanken (D) og i kredsløbet), skal mindst én gang om dagen føres tilbage til den blandede væske ved afbørstning eller på anden passende vis.

Hvis slammet ikke sedimenterer, kan dets massefylde øges ved tilsætning af 2 ml-portioner af en 5 % ferrichloridopløsning; dette gentages om fornødent.

Udløbet opsamles i tank (E) eller (F) i 20 til 24 timer, og der udtages en prøve efter grundig blanding. Tanken (E eller F) må omhyggeligt rengøres.

For at kunne overvåge og kontrollere, at processen er effektiv, måles mindst to gange om ugen det kemiske oxygenforbrug (COD) eller indholdet af opløst organisk kulstof (DOC) både i filtratet af det akkumulerede udløb og i det filtrerede indløb (der bruges en membran med en porestørrelse på 0,45 µm, idet de første (ca.) 20 ml af filtratet bortkastes.

COD- eller DOC-reduktionen skulle flade ud, når der er opnået en nogenlunde regelmæssig daglig nedbrydning.

Tørstofindholdet i det aktiverede slam i luftningstanken bestemmes mindst to gange om ugen (i g/l). Man kan benytte enhederne på to forskellige måder: enten bestemmes det aktiverede slams tørstofindhold to gange ugentligt, og hvis det er over 2,5 g/l, bortkastes det overskydende aktiverede slam, eller der fjernes dagligt 500 ml blandet væske fra hver krukke, således at slammet får en middelopholdstid på seks dage.

Når de målte og skønnede parametre (processens effektivitet (med hensyn til COD- eller DOC-fjernelse), slamkoncentration, slamsedimenteringsegenskaber, udløbenes uklarhed osv.) for de to enheder er tilstrækkeligt stabile, kan teststoffet tilsættes indløbet til den ene af enhederne (i henhold til 1.6.2.2).

Det er også muligt at tilsætte teststoffet ved begyndelsen af slamdannelsesperioden (1.6.2.1), især hvis slammet tilsættes som inokulum.

1.6.2.2. Test

Arbejdsbetingelserne er de samme som for indkøringsperioden, og der tilsættes så meget stamopløsning (ca. 1 %) af teststoffet til testenhedens indløb, at den ønskede teststofkoncentration (ca. 10 til 20 mg DOC/l eller 40 mg COD/l) i spildevandet opnås. Det kan ske ved, at stamopløsningen blandes i spildevandet dagligt eller ved hjælp af et særskilt pumpesystem. Denne koncentration kan opnås gradvis. Hvis teststoffet ikke har nogen toksiske virkninger på det aktiverede slam, kan også højere koncentrationer testes.

Blindprøveenheden tilføres kun indløb uden tilsatte stoffer. Der udtages passende mængder af udløbene til analyse, og de filtreres gennem membranfiltre (0,45 µm), idet de første (ca.) 20 ml filtrat bortkastes.

De filtrerede prøver skal analyseres samme dag eller konserveres ved en egnet metode, f.eks. ved brug af 0,05 ml af en 1 % mercurichloridopløsning ($HgCl_2$) for hver 10 ml filtrat eller ved opbevaring ved 2 til 4° C i indtil 24 timer eller under − 18° C i en længere periode.

Indkøringstiden med tilsætning af teststoffet bør ikke være på over seks uger, og vurderingsperioden bør ikke være på under tre uger, dvs. at der foreligger 14 til 20 bestemmelser til beregning af det endelige resultat.

Koblingsmetoden:

Enhederne kobles ved at ombytte 1,5 l blandet væske (inkl. slam) mellem de to enheders luftningskamre en gang om dagen. Hvis der er tale om stærkt adsorberende teststoffer, tages der kun 1,5 l supernatant fra sedimenteringstankene, som hældes i den anden enheds aktivslamtank.

1.6.2.3. Analyse

Der kan foretages to former for analyse for at følge, hvad der sker med stoffet:

DOC og COD

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationerne med kulstofanalysatoren og/eller af COD-værdierne ifølge reference 2.

Specifik analyse:

Teststofkoncentrationerne bestemmes ved en egnet analysemetode. Når det er muligt, foretages der en særlig bestemmelse af det stof, der er adsorberet på slammet.

2. DATA OG VURDERING

2.1. Koblingsmetoden

Når koblingsmetoden anvendes, udregnes den daglige fjernelse, DR, ifølge 1.2.1.

De daglige værdier for fjernelse, DR, korrigeres for den materialeoverførsel, der skyldes transinokuleringen, og benævnes DRc; der benyttes ligning [2] for en tre timers eller ligning [3] for en seks timers middelopholdstid.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \qquad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \qquad [3]$$

Gennemsnittet af DRc-værdierne udregnes samt standardafvigelsen ifølge ligning [4].

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n - 1}} \qquad [4]$$

hvor:

S_{DRc} = DRc-værdiernes standardafvigelse

$\overline{DRc}$ = gennemsnit af DRc-værdierne

n = antal bestemmelser.

Outliers i DRc-værdierne elimineres ved en egnet statistisk fremgangsmåde, f.eks. Nalimov (reference 6), på 95 % sandsynlighedsniveauet, og gennemsnit og standardafvigelse for DRc-datasættet uden outliers udregnes igen.

Slutresultatet udregnes derefter med ligning [5] som:

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \qquad [5]$$

hvor:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelværdien af t for n værdipar af E og E_0 og ved en statistisk konfidens på P ($P = 1 - \alpha$), hvor P sættes til 95 % (reference 1).

Resultatet angives som gennemsnittet med tolerancer på 95 % sandsynlighedsniveauet, den tilsvarende standardafvigelse og antallet af data i DRc-datasættet uden outliers samt antallet af outliers, f.eks.:

DRc = 98,6 ± 2,3 % DOC-fjernelse

s = 4,65 % DOC-fjernelse

n = 18

x = antal outliers.

2.2. Metode uden kobling

Enhedernes ydeevne kan kontrolleres på følgende måde:

$$\text{procent fjernelse af COD eller DOC} = \frac{\text{COD eller DOC i spildevand} - \text{COD eller DOC i afløb}}{\text{COD eller DOC i spildevand}} \times 100$$

Den daglige fjernelse kan afbildes grafisk, således at det fremgår, om der er nogen tendenser til f.eks. tilvænning.

2.2.1. *Benyttelse af COD/DOC-bestemmelser*

Den daglige procent fjernelse, % DR, udregnes ifølge 1.2.1.

Gennemsnittet af DR-værdierne udregnes samt standardafvigelsen ifølge:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DR} - DR_i)^2}{n - 1}} \qquad [6]$$

hvor:

S_{DR} = DR_i-værdiernes standardafvigelse

$\overline{DR}$ = gennemsnit i DR_i-værdierne

n = antal bestemmelser,

Outliers i DR-værdierne elimineres ved en egnet statistisk fremgangsmåde, f.eks. Nalimov (reference 6), på 95 % sandsynlighedsniveauet, og gennemsnit og standardafvigelse for DR-datasættet uden outliers udregnes igen.

Slutresultatet udregnes derefter med ligning [7] som:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \qquad [7]$$

hvor:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelværdi af t for n værdipar af E og E_0 og ved en statistisk konfidens på P ($P = 1 - \alpha$), hvor P sættes til 95 % (reference 1).

Resultatet angives som gennemsnittet med tolerancer på 95 % sandsynlighedsniveauet, den tilsvarende standardafvigelse og antallet af data i DR-datasættet uden outliers samt antallet af outliers, f.eks.:

DR = (98,6 ± 2,3) % DOC-fjernelse

s = 4,65 % DOC-fjernelse

n = 18

x = antal outliers.

2.2.2. *Benyttelse af specifik analyse*

Den procentdel teststof, der elimineres fra den vandige fase (R_w), udregnes ifølge 1.2.2.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— det i tillæg III gengivne skema, der viser arbejdsbetingelserne for testen

— det valgte apparatur (OECD Confirmatory tester eller porous pot)

— den valgte arbejdsmetode: koblingsmetode eller ej

— form for spildevand: syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand. Hvis der er tale om husholdningsspildevand anføres dato og sted for prøveudtagning

— anvendt inokulum med dato og sted for prøvens udtagning

— angivelse af analysemetoden, hvis der er foretaget specifikke analyser, og en beskrivelse af den

— afbildning af COD- eller DOC-fjernelse mod tiden, herunder indkørings- og vurderingsperiode

— analytisk genfinding af teststoffet som COD eller DOC i stamopløsningen

— afbildning af den procentvise fjernelse af teststof fra den vandige fase mod tiden (indkøringsperiode og vurderingsperiode), hvis der er foretaget specifikke analyser

— den gennemsnitlige fjernelse af DOC, COD eller teststof samt standardafvigelse udregnes af resultaterne fra vurderingsperioden, dvs. når der er en stabil fjernelse af teststof

— afbildning af aktivslamkoncentration mod tiden

— eventuelle bemærkninger vedrørende det aktiverede slam (bortkastet overskydende slam, forekomst af klumpdannelse $FeCl_3$ osv.)

— teststofkoncentration benyttet ved testen

— eventuelle resultater af analyser af slammet

— alle oplysninger og forsøgsresultater vedrørende teststoffet og referencestoffer, hvis sådanne er anvendt

— videnskabelige grunde til eventuelle ændringer af fremgangsmåden.

3.2. Fortolkning af Resultaterne

Hvis den procent teststof, der fjernes fra den vandige fase, er lav, kan de skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismer. Også lysis og tab af slam, som giver uklar supernatant, samt nedsat effektivitet med hensyn til fjernelse af COD (eller DOC) kan afsløre dette.

Undertiden kan fysisk-kemisk adsorption spille en rolle. Forskelle mellem biologisk virkning på molekylet og fysisk-kemisk adsorption kan afsløres ved analyse af slammet efter passende desorption.

Der kræves yderligere tests, hvis der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption.

Det kan gøres på flere forskellige måder, men den mest overbevisende er brug af supernatanten som inokulum i en basis-sæt test (helst respirometrisk test)

Hvis det observeres, at den procentvise fjernelse af DOC eller COD er høj, skyldes dette bionedbrydning, hvorimod der ved lave fjernelsesprocenter ikke kan skelnes mellem bionedbrydning og eliminering. Som eksempel kan nævnes, at hvis et opløseligt stof udviser en høj adsorptionskonstant på 98 %, og der bortkastes 10 % overskydende slam pr. dag, er en eliminering på op til 40 % mulig; hvis der bortkastes 30 % overskydende slam, kan eliminering på grund af adsorption på og fjernelse sammen med overskydende slam komme op på 65 % (reference 4).

Når der benyttes specifik analyse, må man være opmærksom på forholdet mellem stoffets struktur og den benyttede specifikke analyse. I dette tilfælde kan det observerede fænomen ikke fortolkes som en mineralisering af stoffet.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris, *Test Guideline 303 A,* Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Bilag V C9 Nedbrydningstest — kemisk oxygenforbrug Kommissionens direktive 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende,* nr. L 251 af 19. 9. 1984.

(3) Painter, H. A. and King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability.* Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center, UK.

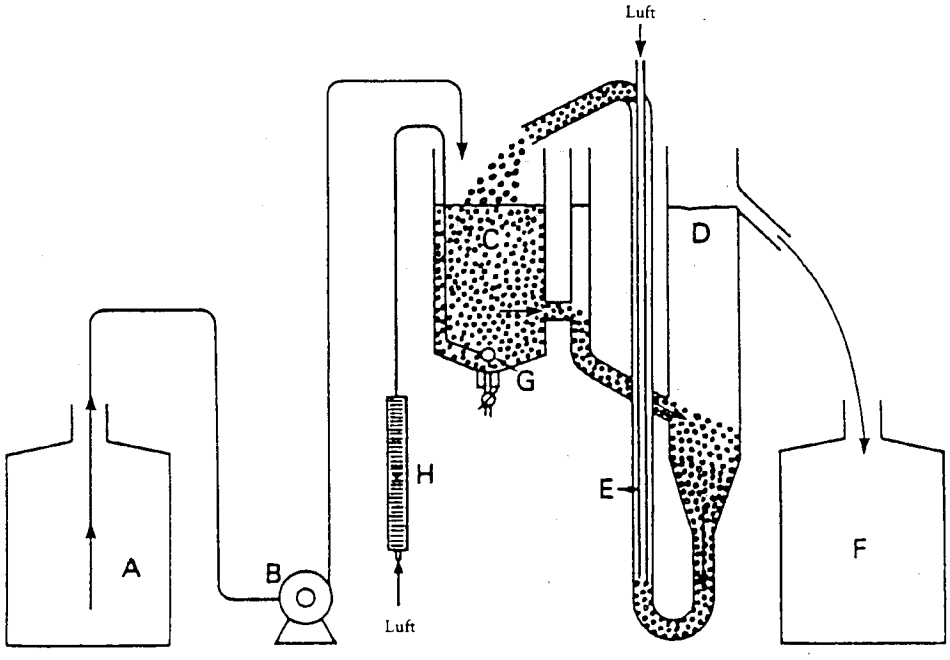
(4) Wierich, P. and Gerike, P., »The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants« — *Ecotoxicology and Environmental Safety,* Vol 5, no 2, June 1981, p. 161, 171.

(5) Rådets direktiv 82/242/EØF og 82/243/EØF *(De Europæiske Fællesskabers Tidende* nr. L 109 af 22. 4. 1982) om ændring af direktiv 73/404/EØF og 73/405/EØF: vaske- og rengøringsmidlers bionedbrydelighed (*De Europæiske Fællesskabers Tidende* nr. L 347 af 17. 12. 1973).

(6) H. Streuli, Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303 (1980) 406—408.

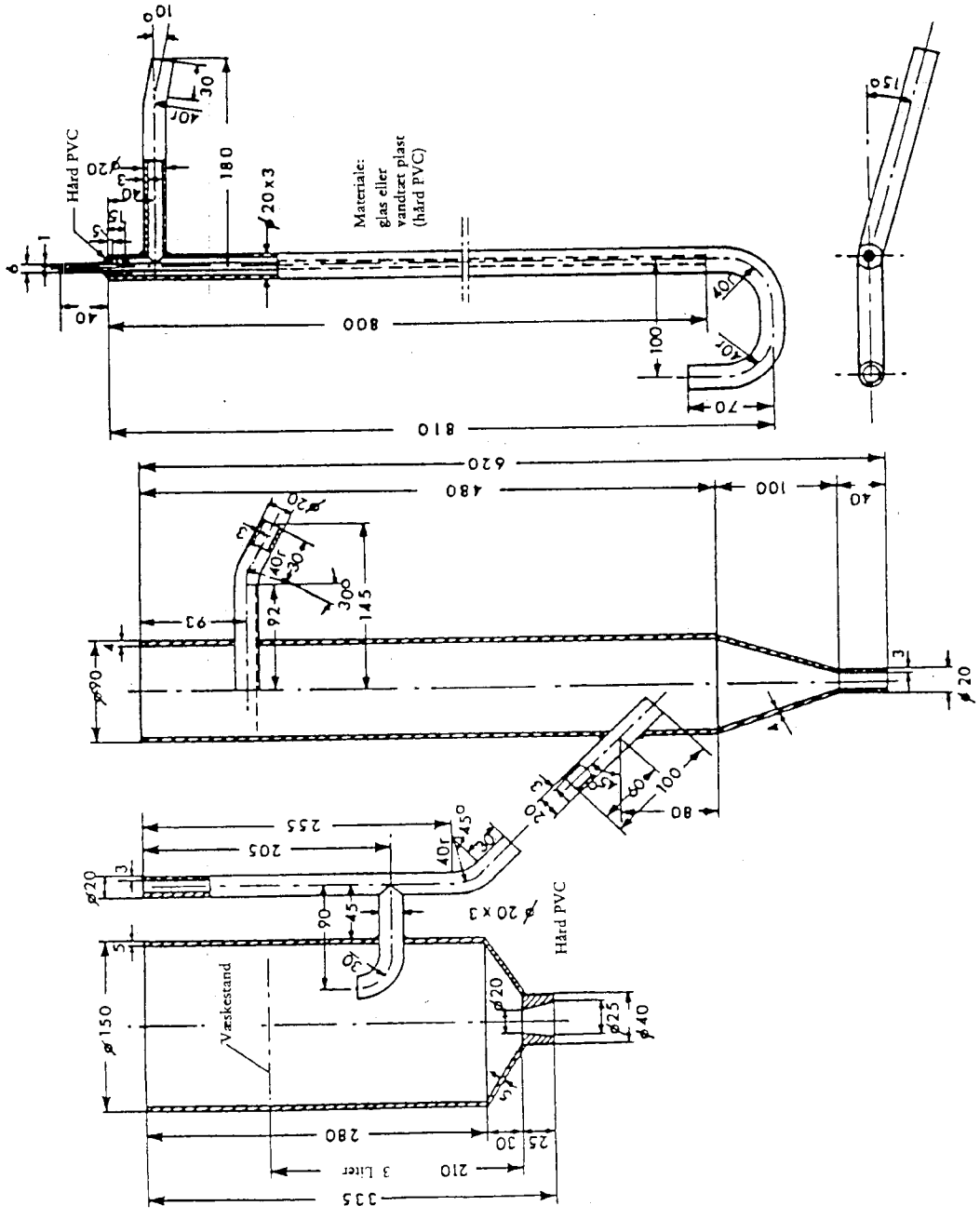
Tillæg 1

Figur 1



A = holdetank
B = doseringspumpe
C = luftningstank (kapacitet 3 l)
D = sedimenteringstank
E = slampumpe
F = opsamlingstank
G = luftningsklods
H = flowmeter (valgfrit)

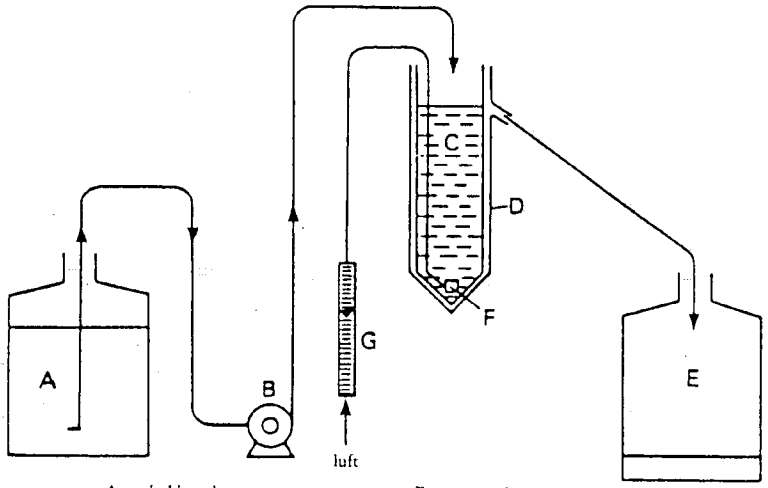
Figur 2


Hård PVC
Materiale:
glas eller
vandtæt plast
(hård PVC)
Hård PVC
Væskestand
3 Liter

Tillæg 2

Figur 1

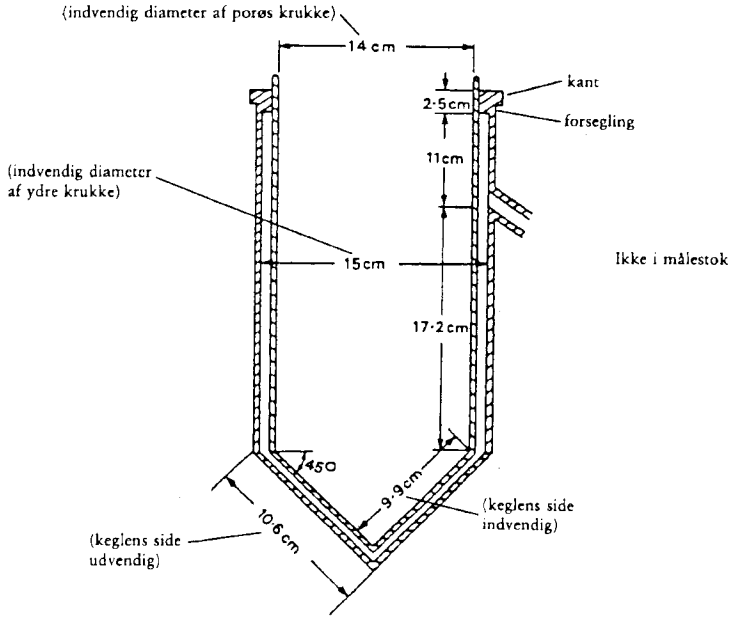
Udstyr til bedømmelse af bionedbrydelighed



A = holdetank
B = doseringspumpe
C = porøs luftningsbeholder
D = ydre vandtæt beholder
E = opsamlingstank
F = luftningsklods
G = rotameter (valgfrit)

Figur 2

Tre-liters porøs luftningskrukke



Ikke i målestok

Tillæg 3

Arbejdsbetingelser for simulationstest for aktiveret slam

Der sættes et kryds i hver gruppe

Apparatur

OECD Confirmatory ☐
Porous Pot ☐

Arbejdsmetode

enkelt enhed ☐
koblede enheder ☐
ikke-koblede enheder ☐

Transinokulering

ingen ☐
aktiveret slam ☐
supernatant ☐

Middelopholdstid

tre timer ☐
seks timer ☐

Basisnæringsstof

husholdningsspildevand ☐
syntetisk spildevand ☐

Inokulum

sekundært spildevand ☐
blandet inokulum ☐
aktiveret slam ☐

Tilsætning af teststof

fra starten ☐
trinvis forøgelse ☐
efter slamdannelse ☐

Analyse

specifik ☐
COD ☐
DOC ☐

C. 11

BIOLOGISK NEDBRYDNING

AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST

1. METODE

1.1. Indledning

Den beskrevne metode vurderer virkningen af et teststof på mikroorganismer ved måling af respirationshastigheden under definerede betingelser ved forskellige koncentrationer af teststoffet.

Formålet med metoden er at give en hurtig screening-metode til identifikation af stoffer, der kan påvirke et aerobt mikrobielt rensningsanlæg uheldigt, og at indikere passende ikke-hæmmende koncentrationer af teststoffer til anvendelse i bionedbrydelighedstests.

Inden den endelige test kan der udføres en forprøve. Den giver oplysninger om det koncentrationsinterval, som skal anvendes i hovedtesten.

I testen indgår to kontroltests, én i begyndelsen og én i slutningen af testrækken. Desuden bør hvert parti aktiveret slam også kontrolleres ved brug af et referencestof.

Metoden kan lettest benyttes for stoffer, der på grund af deres opløselighed i vand og ringe flygtighed sandsynligvis vil forblive i vandet.

Det kan for stoffer med begrænset opløselighed i testmediet vise sig umuligt at bestemme EC_{50}.

Resultater, der er baseret på oxygenoptagelse, kan føre til fejlslutninger, hvis teststoffet har tendens til at afkoble oxidativ phosphorylering.

Det er nyttigt at have følgende oplysninger, når testen skal foretages:

— vandopløselighed

— damptryk

— strukturformel

— teststoffets renhed.

Anbefaling:

Aktiveret slam kan indeholde potentielt patogene organismer og skal håndteres med forsigtighed.

1.2. Definitioner og enheder

Respirationshastigheden er oxygenforbruget hos mikroorganismer i aerobt spildevandsslam og udtrykkes almindeligvis i mg O_2 pr. mg slam pr. time.

Til beregning af et teststofs hæmmende virkning i en bestemt koncentration udtrykkes respirationshastigheden som en procentdel af gennemsnittet af to kontrolrespirationshastigheder:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \% \text{ hæmning}$$

hvor:

R_s = oxygenforbruget ved testkoncentrationen af teststoffet,

RC_1 = oxygenforbruget, kontrol 1,

RC_2 = oxygenforbruget, kontrol 2.

I forbindelse med denne metode er EC_{50} den koncentration af teststoffet, hvorved respirationen er 50 % af den, som kontroltesten viser under de i denne metode beskrevne betingelser.

1.3. **Referencestoffer**

Det anbefales at bruge 3,5-dichlorphenol, som vides at hæmme respiration, som referencestof og at teste det for EC_{50} for hvert parti aktiveret slam for at kontrollere, at slammets følsomhed ikke er unormal.

1.4. **Testmetodens princip**

Respirationshastigheden i aktiveret slam tilført en standardmængde syntetisk spildevand måles efter en kontakttid på 30 minutter og/eller tre timer. Respirationshastigheden i det samme aktiverede slam ved forskellige koncentrationer af teststoffet under i øvrigt identiske betingelser måles også. Teststoffets hæmmende virkning ved en bestemt koncentration udtrykkes som en procentdel af middelrespirationshastigheden i to kontroltests. Der beregnes en EC_{50}-værdi ud fra bestemmelser ved forskellige koncentrationer.

1.5. **Kvalitetskriterier**

Testresultaterne er gyldige, hvis:

— respirationshastigheden i de to kontroltests ligger inden for 15% af hinanden

— EC_{50} (30 minutter og/eller tre timer) for 3,5-dichlorphenol ligger inden for det accepterede område på 5 til 30 mg/l.

1.6. **Beskrivelse af testmetoden**

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Opløsninger af teststoffet

Teststofopløsningerne frisklaves ved undersøgelsens indledning ved brug af en stamopløsning. En stamopløsningskoncentration på 0,5 g/l er egnet, hvis nedenstående anbefalede fremgangsmåde følges.

1.6.1.2. Opløsning af kontrolstoffet

Der fremstilles som eksempel en 3,5-dichlorphenolopløsning ved at opløse 0,5 g 3,5-dichlorphenol i 10 ml 1 M NaOH og fortynde med destilleret vand til ca. 30 ml; derefter tilsættes under omrøring 0,5 M H_2SO_4 til det punkt, hvor udfældning begynder — der kræves ca. 8 ml 0,5 M H_2SO_4 — og endelig fortyndes blandingen med destilleret vand til 1 l. pH skulle derefter være omkring 7 til 8.

1.6.1.3. Syntetisk spildevand

Der kan tillaves syntetisk spildevand ved opløsning af følgende mængder stof i 1 l vand:

— 16 g pepton
— 11 g kødekstrakt
— 3 g urea
— 0,7 g NaCl
— 0,4 g $CaCl_2.2H_20$
— 0,2 g $MgSO_4.7H_20$
— 2,8 g K_2HPO_4.

Note 1: Dette syntetiske spildevand er 100 gange så koncentreret som det, der er beskrevet i OECD Technical Report »Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents« af 11. juni 1976 med tilsætning af dikaliumhydrogenphosphat.

Note 2: Hvis det fremstillede medium ikke anvendes straks, skal det opbevares i mørke ved 0 til 4° C, dog ikke længere end en uge og under forhold som ikke giver anledning til ændring i sammensætningen.

Medium kan også steriliseres forud for oplagringen, eller der kan tilsættes pepton og kødekstrakt kort tid før testen udføres. Umiddelbart før brug blandes omhyggeligt og pH justeres.

1.6.2. *Apparatur*

Måleapparatur: Det er ikke afgørende, hvordan apparaturet nærmere er udformet. Der må imidlertid ikke være luftmellemrum mellem væske og prop, og sonden skal slutte tæt til kolbens hals.

Der kræves normalt laboratorieudstyr og især følgende:

— måleapparatur

— beluftningsapparatur

— pH-elektrode og -måleudstyr

— O_2-elektrode.

1.6.3. *Forberedelse af inokulum*

Som mikrobielt inokulum til testen anvendes aktiveret slam fra et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

På laboratoriet kan grovere praktikler om nødvendigt fjernes ved kort henstand, f.eks. 15 minutter, efterfulgt af dekantering af det øverste lag med finere slampartikler. Alternativt kan slammet anvendes efter blanding i få sekunder i blender. Hertil kommer, at slammet bør vaskes med vand (fra hanen) eller en isotonisk opløsning, hvis hæmmende stoffer kan forudses at være til stede. Efter centrifugering dekanteres supernatanten fra, hvilket gentages tre gange.

En mindre mængde af slammet afvejes og tørres. Herudfra kan beregnes den mængde af vådt slam, som skal suspenderes i vand for at opnå et aktivt slam med et indhold af faste bestanddele suspenderet i en blandet væske på 2 til 4 g/l. Dette svarer til en koncentration på 0,8 til 1,6 g/l i testmediet, hvis den nedenfor anbefalede procedure følges.

Hvis slammet ikke kan anvendes den dag, det er indsamlet, tilsættes der 50 ml syntetisk spildevand til hver liter aktiveret slam, der er fremstillet som ovenfor beskrevet; slammet beluftes derefter natten over ved 20 ± 2° C. Det holdes derefter beluftet, indtil det anvendes den følgende dag. Inden anvendelsen kontroleres pH, som om nødvendigt bufferes til pH 6 til 8. De faste bestanddele, der er suspenderet i den blandede væske, bestemmes som beskrevet i foregående afsnit.

Hvis der er behov for at anvende det samme parti slam de efterfølgende dage (højst fire dage), tilsættes yderligere 50 ml syntetisk spildevand ved hver arbejdsdags slutning.

1.6.4. *Fremgangsmåde*

Varighed/kontakttid:	30 minutter og/eller tre timer under beluftning
Vand:	Drikkevand (om nødvendigt befriet for chlor)
Lufttilførsel:	Ren, oliefri luft. Luftgennemstrøming 0,5 til 1,0 l/min.
Måleapparatur:	Fladbundet kolbe som f.eks. en BOD-kolbe (se figur 1)
Oxygenmåler:	Oxygenelektrode med tilhørende skriver
Næringsopløsning:	Syntetisk spildevand (se ovenfor)
Teststof:	Testopløsningen laves frisk ved testens begyndelse
Referencestof:	F.eks. 3,5-dichlorphenol (mindst tre koncentrationer)
Kontroltest:	Inokuleret prøve uden teststof
Temperatur:	20 ± 2° C.

Nedenfor gives forslag til en eksperimentel procedure, der kan følges for både testen og referencestoffet i tre-timers kontaktperioden:

Der anvendes flere beholdere (f.eks. et-liters bægerglas).

Der benyttes mindst fem koncentrationer med et fast koncentrationsforhold på helst ikke over 3,2.

På tidspunktet »0« fortyndes 16 ml af det syntetiske spildevand med vand til 300 ml. Der tilsættes 200 ml af det mikrobielle inokulum, og hele blandingen (500 ml) hældes i en første beholder (første kontrol C_1).

Testbeholderen skal gennemluftes kontinuerligt for at sikre, at opløst ilt (O_2) ikke falder under 2,5 mg/l, og at iltkoncentrationen er i størrelsesorden 6,5 mg/l umiddelbart før målingen af respirationshastigheden.

På tidspunkt »15 minutter« (15 minutter er et vilkårligt, men bekvemt interval) gentages ovenstående proces, bortset fra at der tilsættes 100 ml teststofstamopløsning til de 16 ml syntetisk spildevand, før der tilsættes vand til 300 ml og mikrobielt inokulum til i alt 500 ml. Denne blanding hældes dernæst i et andet bægerglas og beluftes som omhandlet ovenfor. Denne proces gentages med 15 minutters intervaller med forskellige mængder teststof-stamopløsning, således at der bliver en række beholdere med forskellige koncentrationer af teststoffet. Til slut fremstilles en anden kontrol (C_2).

Efter tre timers forløb måles pH, og efter god blanding hældes en del af den første beholders indhold over i måleapparaturet, og respirationshastigheden måles over en periode på indtil ti minutter.

Denne bestemmelse gentages for hver beholders indhold med 15 minutters intervaller, således at kontakttiden for hver beholder bliver tre timer.

Referencestoffet testes med hver parti mikrobielt inokulum på same måde.

Et andet system (f.eks. mere end én oxygenmåler) vil være nødvendigt, når der skal foretages målinger efter 30 minutters kontakt.

Hvis der kræves måling af det kemiske oxygenforbrug, må der fremstilles andre beholdere, som indeholder teststof, syntetisk spildevand og vand, men ikke aktiveret slam.

Oxygenforbruget måles og registreres efter en beluftningstid på 30 minutter og/eller tre timer (kontakttid).

2. DATA OG VURDERING

Respirationshastigheden beregnes ud fra skriverkurven som mg O_2/l × h mellem ca. 6,5 mg O_2/l og 2,5 mg O_2/l, eller over en ti minutters periode, hvis respirationshastigheden er lav. Den del af respirationskurven, som respirationshastigheden måles over, skal være lineær.

Hvis respirationshastighederne i de to kontroltests ikke ligger inden for 15 % af hinanden, eller hvis referencestoffets EC_{50} (30 minutter og/eller tre timer) ikke ligger inden for det accepterede område (5 til 30 mg/l for 3,5-dichlorphenol), er testen ugyldig og må gentages.

Hæmningsprocenten beregnes ved hver testkoncentration (se 1.2). Hæmningsprocenten aftegnes mod koncentration på semilogaritmisk papir (eller probit), og der udledes en EC_{50}-værdi.

95 %-konfidensgrænserne for EC_{50}-værdierne kan bestemmes ved hjælp af standardprocedurer.

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

- teststof: data for kemisk identifikation
- testsystem: kilde, koncentration og eventuel forbehandling af det aktiverede slam
- testbetingelser:
  - reaktionsblandingens pH før respirationsmåling
  - testtemperatur
  - testens varighed
  - referencestof og dets målte EC_{50}
  - eventuel abiotisk oxygenoptagelse
- resultater:
  - alle målte data
  - hæmningskurve og metode til beregning af EC_{50}
  - EC_{50} og om muligt 95 % konfidensgrænser, EC_{20} og EC_{80}
  - alle observationer og eventuelle afgivelser fra denne testmetode, som kan have haft indflydelse på resultatet.

3.2. Fortolkning af data

EC_{50} værdien må kun betragtes som vejledende for teststoffets sandsynlige toksicitet for enten spildevandsbehandling med aktiveret slam eller mikroorganismer i spildevand, da de komplekse vekselvirkninger, der forekommer i miljøet, ikke kan simuleres nøjagtigt i en laboratorietest. Hertil kommer at teststoffer, som har en hæmmende effekt på ammoniak oxidation også kan give anledning til atypiske hæmningskurver. Sådanne kurver må fortolkes med forsigtighed.

4. REFERENCER

(1) International Standard ISO/8192 — 1986.

(2) Broecker, B. and Zahn, R., *Water Research* 11, 165 (1977).

(3) Brown, D., Hitz, H. R. and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, også beskrevet af:

(5) B. Robra, *Wasser/Abwasser* 117, 80 (1976).

(6) W. Schefer, *Textilveredlung* 6, 247 (1977).

(7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*. Decision of the Council C(81) 30 Final.

C. 12

BIOLOGISK NEDBRYDNING

MODIFICERET SCAS-TEST

1. METODE

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at bedømme den potentielle fuldstændige bionedbrydelighed af vandopløselige, ikke-flygtige organiske stoffer, når disse udsættes for ret høje koncentrationer af mikroorganismer over et længere tidsrum. I dette tidsrum holdes mikroorganismerne i live ved en daglig tilførsel af næring bestående af bundfældet spildevand. (I forbindelse med weekenden kan spildevandet opbevares ved 4° C, eller det syntetiske spildevand til OECD's confirmatory test kan anvendes.)

Der kan finde fysisk-kemisk adsorption sted på de suspenderede faste stoffer, og der skal tages hensyn hertil ved fortolkningen af resultaterne (jf. 3.2).

På grund af den flydende fases lange opholdstid (36 timer), og da der med mellemrum tilføres næringsstoffer, simulerer testen ikke de normale vilkår i et spildevandsanlæg. De resultater, der er opnået med forskellige teststoffer, viser, at denne metode har en høj bionedbrydningsevne.

De betingelser, der skabes i denne metode, letter i høj grad selektion og/eller adaptation af mikroorganismer, der er i stand til at nedbryde teststoffet. (Denne fremgangsmåde kan ligeledes anvendes til at at fremstille akklimatiserede inocula til brug i andre tests.)

I denne test vurderes teststoffernes fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af koncentrationen af opløst organisk kulstof (DOC). Det bør foretrækkes at bestemme koncentrationen af opløst organisk kulstof efter oprensning af den sure opløsning snarere end som forskellen mellem total C og uorganisk C.

Ved samtidig brug af en specifik analysemetode kan teststoffets primære nedbrydning (nedbrydning af en oprindelige kemiske struktur) vurderes.

Denne metode kan kun anvendes på organiske teststoffer, som ved den i analysen anvendte koncentration:

— er opløselige i vand (mindst 20 mg opløst organisk kulstof/l)

— har et ubetydeligt damptryk

— ikke er hæmmende overfor bakterier

— ikke adsorberes væsentligt i testsystemet

— ikke går tabt ved, at testopløsningen skummer.

Teststoffets indhold af organisk kulstof skal være bekendt.

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismer kan være nyttige for fortolkningen for lidet signifikante resultater og for valg af en egnet testkoncentration.

1.2. Definitioner og enheder

C_f = koncentration af organisk kulstof i teststoffet, til stede i eller tilsat det bundfældende spildevand ved begyndelsen af beluftningsperioden (mg/l)

C_t = koncentrationen af opløst organisk kulstof i supernatanten ved afslutningen af beluftningsperioden (mg/l)

C_c = koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrollens supernatant ved afslutningen af beluftningsperioden (mg/l).

Bionedbrydeligheden defineres i denne test som det organiske kulstofs forsvinden. Bionedbrydningen kan udtrykkes som:

1. Den procentvise forsvinden D_{da} af den mængde af stoffet, der tilføres dagligt:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

hvor:

D_{da} = nedbrydning/daglig tilførsel.

2. Den procentvise forsvinden D_{ssd} af den mængde stof, der er til stede ved hver dags begyndelse:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\,(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\,(b)]$$

hvor:

D_{ssd} = nedbrydning/stof ved dagens begyndelse.

Indekserne i og (i + 1) henviser til testdagen; ligning [2(a)] bør anvendes, hvis spildevandets indhold af opløst organisk kulstof svinger fra dag til dag, medens ligning [2(b)] kan anvendes, når mængden af opløst organisk kulstof er forholdsvis konstant fra dag til dag.

1.3. Referencestoffer

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelsen af et nyt stof. Der kan imidlertid ikke anbefales noget bestemt referencestof.

Der angives oplysninger om flere forskellige stoffer, der er evalueret i ringtests (jf. tillæg 1), først og fremmest for at testmetoden af og til kan kalibreres, men også for at resultaterne kan sammenlignes, hvis der anvendes en anden metode.

1.4. Testmetodens princip

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg placeres i en semi-kontinuerlig aktiveret slamenhed (semi-continous activated sludge — SCAS). Teststoffet og bundfældet husholdningsspildevand tilføres, og blandingen beluftes i 23 timer. Beluftningen indstilles derefter, slammet gives tid til at bundfælde sig, og supernatant væsken fjernes.

Det tilbageblevne slam i beluftningskammeret iblandes dernæst en yderligere mængde af teststoffet op spildevandet, hvorefter cyklusen begynder forfra.

Bionedbrydning konstateres ved at bestemme indholdet af opløst organisk kulstof i supernatant væsken. Dette resultat sammenlignes med resultatet af analysen af væsken fra en kontrolenhed, som kun er tilført bundfældet spildevand.

Såfremt der anvendes en specifik analysmetode, kan ændringer i koncentrationen af det oprindelige stof som følge af bionedbrydningen måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. Kvalitetskriterier

Denne metodes reporducerbarhed, baseret på fjernelse af opløst organisk kulstof, er endnu ikke fastslået. (For så vidt angår primær bionedbrydning, er der opnået meget nøjagtige data for let nedbrydelige stoffer).

Metodens følsomhed afhænger i vid udstrækning af variabiliteten i blindprøven og i mindre grad af den nøjagtighed, hvormed indholdet af opløst organisk kulstof kan bestemmes, eller af væskens indhold af teststof ved påbegyndelsen af hver enkelt cyklus.

1.6. Beskrivelse af testproceduren

1.6.1. *Forberedelse*

Et tilstrækkeligt antal rene beluftningsenheder (i stedet kan den oprindelige 1,5 l SCAS-prøveenhed anvendes) og lufttilførselsslanger (figur 1) for hvert enkelt teststof og til kontrollen klargøres. Den komprimerede luft, der tilføres testenhederne, renses med et vatfilter og bør være fri for organisk kulstof og være forudmættet med vand, så fordampningstab reduceres.

Fra et aktiveret slamanlæg der primært behandler husholdningsspildevand, tages en prøve af blandet væske, indeholdende 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter.

Til hver beluftningsenhed kræves ca. 150 ml af den blandede væske.

Stamopløsninger af teststoffet tilberedes i destilleret vand. Den normalt krævede koncentration er 400 mg organisk kulstof pr. liter hvilket giver en koncentration af teststoffet på 20 mg/l ved påbegyndelsen af hver beluftningscyklus, såfremt der ikke finder bionedbrydning sted.

Der kan anvendes højere koncentrationer, hvis toksiciteten over for mikroorganismerne tillader det.

Slamopløsningernes indhold af organisk kulstof måles.

1.6.2. *Testbetingelser*

Testen bør foretages ved 20 til 25° C.

Der anvendes en høj koncentration af aerobe mikroorganismer (fra 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter), og den effektive opholdstid er 36 timer. Det kulstofholdige materiale i det tilførte spildevand iltes grundigt, sædvanligvis inden otte timer efter påbegyndelsen af hver beluftningscyklus. Derefter respirerer slammet endogent i resten af beluftningsperioden, hvorunder det eneste tilgængelige substrat er teststoffet, medmindre også dette metaboliseres hurtigt. Disse forhold, kombineret med daglig genpodning af prøven når husholdningsspildevand anvendes som medium, giver uhyre gunstige betingelser for såvel akklimatisering som høj grad af bionedbrydning.

1.6.3. *Gennemførelsen af testen*

Der fremstilles en prøve af blandet væske fra en laboratorieenhed, der overvejende behandler husholdningsspildevand eller fra et egnet aktiveret slamanlæg, og prøven opbevares under aerobe betingelser indtil anvendelsen i laboratoriet. Hver beluftningsenhed samt kontrolenheden påfyldes 150 ml (hvis den oprindelige SCAS-test anvendes, multipliceres de anførte volumener med 10) blandet væske, og beluftningen påbegyndes. Efter 23 timers forløb indstilles beluftningen, og slammet bundfældes i 45 minutter. Hanen på hver kolbe åbnes successivt, og der udtages 100 ml af supernatant væsken. Der klargøres en prøve bundfældet husholdningsspildevand umiddelbart før brug, og 100 ml heraf tilsættes det tilbageblevne slam i hver beluftningsenhed. Beluftningen påbegyndes på ny. På dette stadium tilsættes intet teststof. Enhederne tilsættes dagligt husholdningsspildevand, men kun indtil det tidspunkt, hvor bundfældningen resulterer i en klar supernatant væske. Dette tager sædvanligvis op til to uger, hvorefter det opløste organiske kulstof i supernatant væsken ved afslutningen af hver beluftningscyklus nærmer sig en konstant værdi.

Ved afslutningen af dette tidsrum blandes de forskellige bundfældede slamprøver, og 50 ml af denne blandede slamprøve tilsættes til hver enhed.

Der tilsættes 95 ml bundfældet spildevand og 5 ml vand til kontrolenhederne, og 95 ml bundfældet spildevand plus 5 ml af den pågældende stamopløsning af teststoffet (400 mg/l) til testenhederne. Beluftningen påbegyndes atter og fortsættes i 23 timer. Slammet bundfældes i 45 minutter, og supernatant væsken fjernes og analyseres for opløst organisk kulstof.

Ovenstående påfyldnings- og aftapgningsprocedure gentages dagligt under hele testens forløb.

Inden bundfældningen kan det være nødvendigt at rense enhedernes vægge for at forhindre akkumulering af faste stoffer over væskens niveau. For at undgå krydskontaminering anvendes der en separat skraber eller børste for hver enkelt enhed.

Ideelt set bør indholdet af opløst organisk kulstof i supernatant væskerne bestemmes dagligt, selv om mindre hyppige analyser kan tillades. Inden analysen filtreres væskerne gennem vaskede membranfiltre med en porestørrelse på 0,45 µm, eller væskerne centrifugeres. Membranfilter er egnede, hvis der er sikkerhed for, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer stoffet under filtreringen. Prøvens temperatur må ikke overstige 40° C, så længe den er i centrifugen.

Testens varighed er ubestemt for stoffer, der udviser ringe eller ingen bionedbrydning. Erfaringerne viser dog, at den generelt bør vare mindst tolv uger, men ikke længere end 26 uger.

2. DATA OG EVALUERING

Værdierne for indholdet af opløst kulstof i supernatant væskerne i testenhederne og i kontrolenhederne afbildes mod tiden i et koordinatsystem.

Efterhånden som nedbrydningen skrider frem, vil niveauet i testenheden nærme sig niveauet i kontrolenheden. Når forskellen mellem de to niveauer er konstant i tre på hinanden følgende målinger, gennemføres der et tilstrækkeligt antal yderligere målinger til en statistisk behandling af dataene, og den procentvise bionedbrydning af teststoffet beregnes (D_{da} eller D_{ssd}, jf. 1.2).

3. RAPPORTERING

3.1. Testrapport

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— fuldstændige oplysninger om spildevandets art, om hvilken type enhed der er anvendt samt om forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, referencestoffet, hvis et sådan er anvendt, og blindprøven

— temperatur

— kurve for det organiske kulstofs forsvinden, med beskrivelse af beregningsmetode (jf. 1.2)

— dato og sted for prøveudtagning af aktiveret slam og spildevand, status vedrørende adaptation, koncentration osv.

— videnskabelige grunde til eventuelle ændringer i testproceduren

— underskrift og dato.

3.2. Fortolkning af resultaterne

Eftersom det stof, der kan testes med denne metode, ikke vil være let bionedbrydeligt, vil enhver forsvinden af opløst organisk kulstof, som udelukkende skyldes bionedbrydning, normalt forløbe gradvis over dage eller uger, undtagen i sådanne tilfælde, hvor akklimatiseringen er pludselig, hvilket fremgår af en abrupt forsvinden efter nogle uger.

Fysisk-kemisk adsorption kan imidlertid nogle gange spille en betydelig rolle. Dette er tilfældet, når der ved begyndelsen indtræder en fuldstændig eller delvis forsvinden af det tilsatte opløste organiske kulstof. Hvad der derefter sker, afhænger af forskellige faktorer, såsom adsorptionsgraden og koncentrationen af suspenderet fast stof i det bortkastede spildevand. Forskellen mellem koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrol- og testenhedernes supernatant væsker øges sædvanligvis gradvis fra den først indtrufne værdi, og denne forskel forbliver dernæst på den nye værdi under resten af forsøget, medmindre der finder akklimatisering sted.

Når der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption, er yderligere analyser påkrævet. Dette kan gøres på flere forskellige måder, men den mest pålidelige metode er at anvende supernatant væsken, eller slam, som podestof i en basissæt test (helst en respirometrisk test).

Teststoffet, der resulterer i omfattende, ikke adsorptiv forsvinden af opløst organisk kulstof, bør i denne test betragtes som potentielt bionedbrydelige. Delvis ikke adsorptiv forsvinden tyder på, at stoffet i hvert fald er bionedbrydeligt til en vis grad.

Ringe eller ingen forsvinden af opløst organisk kulstof kan skyldes teststoffets hæmning af mikroorganismerne. Dette kan ligeledes afsløres af lysis og tab af slam, hvilket giver uklare supernatant væsker. Testen bør i så fald gentages med anvendelse af en lavere koncentration af teststoffet.

Anvendelsen af en specifik analysemetode eller C-14-mærket teststof kan give større følsomhed. Anvendes der et C-14-teststof, vil genfinding af $^{14}CO_2$ bekræfte, at der fundet bionedbrydning sted.

Såfremt der ligeldes angives resultater for primær bionedbrydning, bør der om muligt gives en forklaring på den forandring i den kemiske struktur, der medfører, at det oprindelige teststof ikke kan påvises.

Valideringen af analysemetoden skal anføres sammen med værdierne for blindprøvemediet.

4. REFERENCER

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*. Decision of the Council C(81) 30 Final.

Tillæg 1

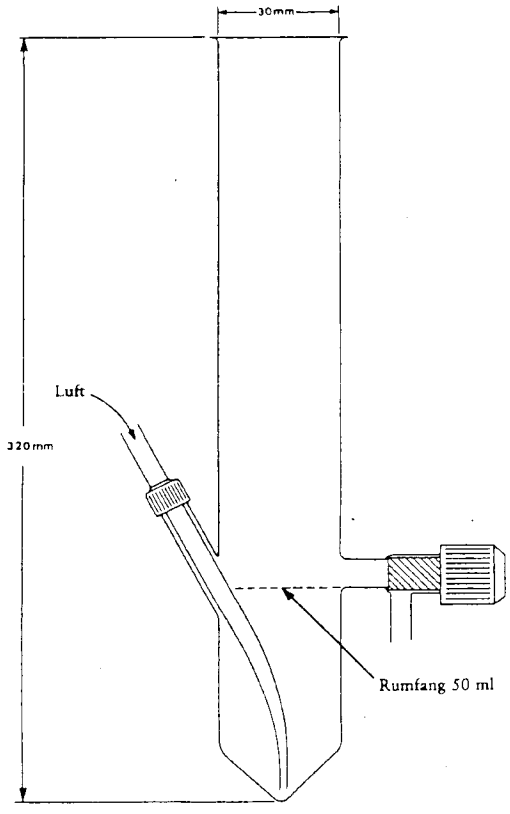
SCAS-test: eksempel på resultater

Stof	C_T (mg/l)	$C_c - C_c$ (mg/l)	Procent bionedbrydning D_{da}	Testens varighed (dage)
4-acetylaminobenzensulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropylenbenzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrophenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylen glycol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentantetracarboxylat	17,9	3,2	81,1	120

Tillæg 2

Eksempel på apparatur

Figur 1



C.13 BIOKONCENTRERING: GENNEMSTRØMNINGSTEST MED FISK

1. METODE

Denne biokoncentreringsmetode er en gengivelse af OECD Test Guideline 305 (1996).

1.1. Indledning

I denne metode beskrives en fremgangsmåde for karakterisering af stoffers biokoncentreringspotentiale i fisk under gennemstrømning. Test ved gennemstrømning er langt at foretrække, men også semi-statiske systemer tillades, forudsat at gyldighedskriterierne er opfyldt.

Testen er så detaljeret beskrevet, at den kan udføres, samtidig med at der er tilstrækkelig frihed til at tilpasse tilrettelægningen af forsøgene til særlige forhold i laboratorierne og teststoffernes særlige egenskaber. Metoden er bedst til stabile organiske kemiske stoffer med en log P_{ow} -værdi mellem 1,5 og 6,0 (1), men den kan også anvendes for ekstremt lipofile stoffer (med log $P_{ow} > 6,0$). Den på forhånd skønnede biokoncentreringsfaktor (BCF), undertiden benævnt K_B, for sådanne ekstremt lipofile stoffer vil normalt være højere end den værdi af ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}), man må forvente at finde ved laboratorieforsøg. Forhåndsskøn over biokoncentreringsfaktoren for organiske stoffer med log P_{ow}-værdier op til ca. 9,0 kan beregnes efter udtrykket i Bintein et al (2). De parametre, der karakteriserer biokoncentreringspotentialet, er hastighedskonstanten for optagelse (k_1), hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) og BCF_{SS}.

Radioaktivt mærkede teststoffer kan gøre analyse af vand- og fiskeprøver lettere og kan benyttes til at afgøre, om der skal foretages identifikation og kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsprodukter. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles (f.eks. ved forbrænding eller opløsning af væv), vil BCF blive baseret på den oprindelige forbindelse, eventuelle tilbageholdte metabolitter og assimileret kulstof. BCF-værdier, der baseres på det samlede indhold af radioaktivt materiale, kan derfor ikke altid sammenlignes direkte med en BCF-værdi, der er bestemt ved specifik kemisk analyse for den oprindelige forbindelse alene.

Ved undersøgelser med radioaktivt mærkede stoffer kan der benyttes oprensningsprocedurer til bestemmelse af BCF baseret på den oprindelige forbindelse, og de vigtigste metabolitter kan om nødvendigt karakteriseres. Man kan også kombinere en undersøgelse af metabolisme i fisk med en biokoncentreringsundersøgelse ved at analysere og identificere stofrester i væv.

1.2. Definitioner og enheder

Ved *biokoncentrering/bioakkumulering* forstås en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme (eller specificerede væv deraf) i forhold til koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium.

Ved *biokoncentreringsfaktoren* (BCF eller K_B) på et givet tidspunkt under optagelsesfasen af akkumuleringstesten forstås koncentrationen af teststoffet i/på fiskene eller specificerede væv deraf (C_f i µg/g (ppm)) divideret med koncentrationen af det kemiske stof i det omgivende medium (C_W i µg/ml (ppm)).

Ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS} eller K_B) ændrer sig ikke væsentligt over et længere tidsrum, idet koncentrationen af teststoffet i det angivende medium er konstant i dette tidsrum.

Man taler om et *plateau* eller en *ligevægtstilstand* i afbildningen af teststoffet i fisk (C_f) mod tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af C_f i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikante forskelle mellem de tre prøveudtagningsperioder. Ved pooling af prøver til analyse, kræves der mindst fire på hinanden følgende analyser. For teststoffer, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende.

En *biokoncentreringsfaktor,* der er beregnet direkte ud fra kinetiske hastighedskonstanter (k_1/k_2), betegnes den kinetiske koncentreringsfaktor, BCF_K.

Ved octanol-vand fordelingskoefficienten (P_{ow}) forstås forholdet mellem et kemisk stofs opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt (metode A.8), også betegnet K_{ow}. Logaritmen til P_{ow} benyttes som rettesnor for et kemisk stofs potentiale for biokoncentrering i vandorganismer.

Ved *eksponeringsfasen* eller *optagelsesfasen* forstås det tidsrum, hvori fiskene udsættes for teststoffet.

Ved *hastighedskonstant for optagelse* (k_1) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsforøgelsen af teststoffet i eller på fiskene (eller specificerede væv deraf), når fiskene udsættes for stoffet (k_1 udtrykkes i dag^{-1}).

Ved *udskillelsesfasen* forstås det tidsrum efter overførsel af forsøgsfiskene fra et medium med teststoffet i til et medium uden stoffet, hvor man undersøger udskillelsen (eller nettoafgivelsen) af stoffet fra forsøgsfiskene (eller specificerede væv deraf).

Ved *hastighedskonstant for udskillelse* (k_2) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsfaldet af teststoffet i forsøgsfiskene (eller specificerede væv deraf), efter at de er overført fra et medium med teststoffet i til et medium uden dette stof (k_2 udtrykkes i dag^{-1}).

1.3. Testmetodens princip

Testen falder i to faser, en eksponeringsfase (optagelsesfase) og en udskillelsesfase. I optagelsesfasen udsættes separate grupper af fisk af én art for mindst to koncentrationer af teststoffet. De overføres dernæst til et medium uden teststoffet, hvor udskillelsesfasen forløber. Der kræves altid en udskillelsesfase, undtagen hvis optagelsen af stoffet under eksponeringsfasen har været ubetydelig (f.eks.hvis BCF er mindre end 10). Under begge testens faser følges koncentrationen af stoffet i eller på fiskene (eller specificerede væv deraf). Der holdes samtidig en kontrolgruppe af fisk under samme betingelser bortset fra, at der ikke er noget teststof til stede, så man kan sammenholde eventuelle skadevirkninger i biokoncentreringstesten med en tilsvarende kontrolgruppe og bestemme baggrundskoncentrationer af teststof.

Optagelsesfasen varer i 28 dage, medmindre det godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Ud fra ligningerne i bilag 3 kan man forudsige, hvor lang tid optagelsesfasen vil vare, og hvor lang tid der vil gå, inden der er ligevægt. Udskillelsesperioden indledes dernæst ved, at fiskene overføres til en ren beholder med samme medium, men uden teststof. Når det er muligt, beregnes biokoncentreringsfaktoren både som forholdet (BCF_{SS}) mellem koncentrationen i fiskene (C_f) og i vandet (C_w) ved ligevægt, og som kinetisk biokoncentreringsfaktor (BCF_K) som forholdet mellem hastighedskonstanterne for optagelse (k_1) og udskillelse (k_2), idet kinetikken antages at være af første orden. Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, må der benyttes mere komplekse modeller (bilag 5).

Hvis der ikke nås ligevægt inden 28 dage, forlænges optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 60 dage: derefter påbegyndes udskillelsesfasen.

Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for udskillelse (eller konstanterne, hvis der er tale om mere komplekse modeller), biokoncentreringsfaktoren og så vidt muligt konfidensgrænser for hver af disse parametre beregnes ud fra den model, der bedst beskriver de målte koncentrationer af teststof i fisk og vand.

BCF udtrykkes som en funktion af fiskenes samlede vægt. I særlige tilfælde kan dog bestemte væv eller organer (f.eks. muskelvæv eller lever) anvendes, hvis fiskene er tilstrækkelig store, eller fiskene kan opdeles i en spiselig fraktion (filet) og en ikke-spiselig fraktion (indvolde). Da der for mange organiske stoffer er en tydelig sammenhæng mellem biokoncentreringspotentialet og stoffets lipofile karakter, er der en tilsvarende sammenhæng mellem forsøgsfiskenes fedtindhold og stoffernes observerede biokoncentrering. For at imødegå sådanne udsving i forsøgsresultater for stærkt lipofile stoffer (dvs. log $P_{ow} > 3$) bør biokoncentreringen udtrykkes både i forhold til fedtindholdet og i forhold til den samlede legemsvægt.

Fedtindholdet skal om muligt bestemmes på det samme biologiske materiale, som benyttes til bestemmelse af teststoffets koncentration.

1.4. Oplysninger om teststoffet

Inden biokoncentreringstesten udføres, skal følgende oplysninger om teststoffet foreligge:

a) opløselighed i vand

b) octanol-vand fordelingskoefficient P_{ow} (betegnes også K_{ow}, bestemt ved en HPLC-metode i A.8)

c) hydrolyse;

d) fotokemisk omdannelse i vand bestemt ved bestråling med sollys og simuleret sollys under samme bestrålingsforhold som ved testen for biokoncentrering (3)

e) overfladespænding (dvs. for stoffer, hvis P_{ow} ikke kan bestemmes)

f) damptryk

g) umiddelbar bionedbrydelighed (når det er relevant)

Blandt andre nødvendige oplysninger er toksiciteten over for den fiskeart, der benyttes til testen, helst den asymptotiske (dvs. tidsuafhængige) LC_{50}. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af teststoffet i opløsninger og biologisk materiale og oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares. Hvis der bruges ^{14}C-mærkede teststoffer, skal den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, være kendt.

1.5. Testens gyldighed

Følgende betingelser skal være til stede for, at testen betragtes som gyldig:

— temperaturudsving må ikke være større end ± 2 °C

— koncentrationen af opløst oxygen må ikke komme under 60 % af mætning

— koncentrationen af teststoffet i kamrene skal ligge inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier under eksponeringsfasen

— dødeligheden og andre skadevirkninger/sygdomme må ved testens afslutning højst være 10 % både i kontrolgruppen og i de eksponerede fisk: hvis testen strækker sig over flere uger eller måneder, må dødsfald og andre skadevirkninger i begge grupper højst være 5 % om måneden og højst 30 % i alt.

1.6. Referencestoffer

Det kan være nyttigt at anvende referencestoffer med kendt biokoncentreringspotentiale til kontrol af forsøgsmetoden, hvis dette er påkrævet. Der kan dog endnu ikke anbefales nogen bestemte stoffer.

1.7. Beskrivelse af testmetoden

1.7.1. *Apparatur*

Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, der kan opløses eller adsorbere, absorbere eller afgive stoffer og have en skadelig virkning på fiskene. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardkar af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af fisk. Bløde plastslanger bør benyttes mindst muligt. Der skal helst bruges rør og slanger af teflon (R), rustfrit stål eller glas. Erfaringerne har vist, at det til stoffer med høj adsorptionskoefficient såsom syntetiske pyrethroider kan være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde må udstyret kasseres efter brug.

1.7.2. *Vand*

Til testen benyttes sædvanligvis råvand, som skal være af ensartet kvalitet og komme fra en ikke-forurenet kilde. Vand til fortynding skal være af en sådan kvalitet, at den valgte fiskeart kan overleve akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Allerhelst bør det godtgøres, at fiskearten kan overleve, vokse og formere sig i fortyndingsvandet (f.eks. i laboratorie-kultur eller en toksicitetstest over en hel livscyklus). Vandet skal beskrives i hvert fald ved sit pH, hårdhed, tørstof i alt og organisk kulstof i alt, og gerne også indholdet af ammonium, nitrit og nitrat, samt for saltvandsfisk saltholdigheden. Selv om det er velkendt, hvilke parametre der er vigtige for fisks velfærd, er der i bilag 1 anført anbefalede maksimumkoncentrationer for en række parametre for fersk- og saltvand til forsøg.

Vandet skal være af konstant kvalitet under hele forsøget. Dets pH skal være mellem 6 og 8,5, men for en given test skal det ligge konstant inden for ± 0,5. For at sikre at fortyndingsvandet ikke ubehørigt påvirker forsøgsresultatet (f.eks. ved kompleksdannelse med teststoffet) eller indvirker negativt på fiskebestanden, udtages der regelmæssigt prøver til analyse. Indholdet af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), vigtige anioner og kationer (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4) pesticider (f.eks. organiske phosphorforbindelser i alt og organiske chlorforbindelser i alt), organisk kulstof i alt og opslæmmet tørstof bør bestemmes f.eks. hver tredje måned, når fortyndingsvandet vides at være af forholdsvis konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten kan påvises at have været konstant i mindst et år, kan hyppigheden sættes ned (til f.eks. hvert halve år).

Både det naturlige partikelindhold og indholdet af organisk kulstof i alt (TOC) i fortyndingsvandet skal være så lavt som muligt, så man undgår absorption af teststoffet til organisk materiale, hvilket kan nedsætte dets biotilgængelighed (4). Den højeste acceptable værdi er 5 mg/l for partikler (tørstof, der ikke passerer et 0,45 µm filter) og 2 mg/l for organisk kulstof i alt (se bilag 1). Om nødvendigt må vandet filtreres inden brugen. Bidraget til indholdet af organisk kulstof i vandet fra testfiskene (ekskrementer) og føderester skal holdes så lavt som muligt. Under hele testen må koncentrationen af organisk kulstof i testkarret ikke overstige koncentrationen af organisk kulstof hidrørende fra test-stoffet og et eventuelt opløsende stof med mere end 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Testopløsninger*

Der fremstilles en stamopløsning af teststoffet med en passende koncentration. Den skal helst fremstilles ved simpel blanding eller omrystning af teststoffet med vand. Brug af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler (opløsende stoffer) anbefales ikke, men det kan i visse tilfælde være nødvendigt for at opnå en passende koncentreret stamopløsning. som opløsningsmiddel kan der benyttes ethanol, methanol, ethylenglycol-monomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose eller HCO-40. Der bør udvises forsigtighed med brug af let bionedbrydelige midler, da de kan skabe problemer med bakterievækst i test med gennemstrømning. Teststoffet kan være radioaktivt mærket og skal være af størst mulig renhed (f.eks. helst > 98 %).

Til forsøg med gennemstrømning kræves der er system, der kontinuerligt leverer og fortynder en stamopløsning af teststoffet (f.eks. doseringspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), til tilførsel af teststoffet til kamrene. Der tilstræbes en udskiftning på mindst fem gange dagligt pr. testkammer. Gennemstrømningsmetoden bør foretrækkes, men kan det ikke lade sig gøre (f.eks. hvis testorganismerne tager skade), kan der bruges en semi-statisk teknik, forudsat at gyldighedskriterierne er opfyldt. Flowhastighederne for stamopløsning og fortyndingsvand kontrolleres 48 timer før testens begyndelse og derefter mindst dagligt under testen. Ved denne kontrol måles flowet i hvert test-kammer, og det sikres, at det ikke varierer med mere end 20 %, hverken inden for hvert kammer eller mellem kamrene.

1.7.4. *Valg af fiskeart*

Blandt de vigtige kriterier ved valg af fiskearten er, at den skal være let at få fat i, kunne fås i passende størrelser og let kunne holdes i laboratoriet. Andre kriterier for valg af fiskeart kan være dens rekreative, kommercielle eller økologiske betydning, dens følsomhed i forhold til andre arter og gode erfaringer med den.

I bilag 2 er anført nogle fiskearter, som anbefales til test. Der kan anvendes andre arter, men testmetoden må i så fald tilpasses, så testbetingelserne bliver passende. Der skal da anføres en begrundelse for valg af art og testmetode.

1.7.5. *Opbevaring af fisk*

Stampopulationen af fisk akklimatiseres i mindst to uger i vand ved testtemperaturen og gives hele tiden tilstrækkeligt af det foder, som skal benyttes under testen.

Efter en 48-timers tilpasningsperiode noteres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:

— dødelighed over 10 % efer syv dage: hele partiet forkastes

— dødelighed mellem 5 % og 10 % efter syv dage: akklimatiseringen fortsættes i endnu syv dage

— dødelighed under 5 % efter syv dage: partiet accepteres; hvis dødeligheden er over 5 % efter endnu syv dage, forkastes hele partiet.

Det sikres, at ingen af fiskene til testen har synlige sygdomme eller misdannelser. Syge fisk kasseres. Fisk må ikke behandles mod sygdomme hverken under testen eller i to uger forud for testen.

1.8. **Testens udførelse**

1.8.1. *Indledende test*

Det kan være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment med henblik på at optimere testbetingelserne for den endelige test, f.eks. valg af koncentration(er) af teststoffet og længden af eksponerings- og udskillelsesfasen.

1.8.2. *Eksponeringsbetingelser*

1.8.2.1. Optagelsesfasens længde

Forudsigelse af optagelsesfasens længde kan ske på grundlag af praktiske erfaringer (f.eks. fra en tidligere undersøgelse eller et andet kemisk stof, der akkumuleringsmæssigt ligner) eller ved hjælp af forskellige empiriske sammenhænge ud fra kendskab til stoffets opløselighed i vand eller dets octanol/vand fordelingskoefficient (se bilag 3).

Optagelsesfasen bør vare 28 dage, medmindre det kan godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Er der ikke opnået ligevægt efter 28 dage, forlænges optagelsesfasen, og målingerne fortsættes, indtil der er nået ligevægt, dog højst 60 dage.

1.8.2.2. Udskillelsesfasens længde

Normalt er en periode på halvdelen af optagelsesfasen tilstrækkeligt til at opnå et passende fald (f.eks. 95 %) i fiskenes belastning med stoffet (se redegørelsen for skønnet i bilag 3). Hvis der skal bruges urealistisk lang tid til at opnå et fald på 95 %, f.eks. dobbelt så lang tid som en normal optagelsesfase (dvs. mere end 56 dage), kan tidsrummet sættes ned (dvs. indtil koncentrationen af teststoffet er mindre end 10 % af ligevægtskoncentrationen). For stoffer med mere komplekse optagelses- og udskillelsesmønstre end det, hvor fisken betragtes som en helhed, og hvor der gælder førsteordenskinetik, må der dog benyttes en længere udskillelsesfase til bestemmelse af hastighedskonstanterne. periodens længde kan f.eks. bestemmes af, hvor længe koncentrationen af teststoffet i fiskene er højere end påvisningsgrænsen.

1.8.2.3. Antal testfisk

Der udvælges så mange fisk pr. testkoncentration, at der mindst er fire fisk til rådighed pr. prøve ved hver prøveudtagning. Ønskes der større statistisk styrke, må antallet af fisk pr. prøveøges.

Hvis der benyttes voksne fisk, anføres i rapporten, om der er brugt hanner, hunner eller begge køn i eksperimentet. Hvis begge køn er anvendt, skal det dokumenteres, at der inden eksponeringen ikke er nogen signifikant forskel i fedtindhold mellem kønnene; pooling af alle hanner og hunner kan være påkrævet.

Til en given test udvælges der fisk af samme vægt, således at den mindste ikke vejer mindre end to tredjedele af den største. Alle fisk skal være af samme årgang og komme fra samme kilde. Da fiskenes alder og vægt undertiden synes at indvirke signifikant på BCF-værdierne (1), skal disse oplysninger noteres nøjagtigt. Det anbefales, at man inden testen danner sig et skøn over gennemsnitsvægten ved at veje en delprøve af fiskebestanden.

1.8.2.4. Belastning

Der benyttes et højt forhold mellem vand og fisk, så faldet i C_w som følge af overførsel af fiskene ved testens begyndelse bliver så lille som muligt, og for at undgå, at koncentrationen af opløst oxygen falder. Det er vigtigt, at belastningen afpasses efter den anvendte fiskeart. I alle tilfælde anbefales normalt en belastning på 0,1-1,0 g fisk (våd vægt) pr. liter vand pr. dag. Belastningen kan sættes op, hvis det godtgøres, at den nødvendige koncentration af teststof kan fastholdes inden for ± 20 %, og at koncentrationen af opløst oxygen ikke kommer under 60 % af mætning.

Der skal tages hensyn til fiskeartens normale levevilkår ved valget af belastning. Eksempelvis kan bundfisk kræve større bundareal i akvariet for samme vandrumfang end pelagiske fiskearter.

1.8.2.5. Fodring

Under akklimatisering og test gives fiskene passende foder med kendt fedt- og proteinindhold i en sådan mængde, at de forbliver sunde og bevarer deres legemsvægt. Fiskene fodres dagligt under akklimatisering og test med en mængde svarende til ca. 1-2 % af legemsvægten; på denne måde holdes fedtkoncentrationen i de fleste fiskearter nogenlunde konstant under testen. Fodermængden beregnes på ny f.eks. en gang om ugen, så legemsvægt og fedtindhold holdes konstant. Til denne beregning kan man skønne vægten af fiskene i de enkelte kamre ud fra vægten af de fisk, der senest er taget op fra det pågældende kammer. De fisk, der bliver tilbage i kamrene, må ikke vejes.

Hver dag kort efter fodringen (30 min.-1 time) suges overskydende foder og ekskrementer op fra testkamrene. Kamrene holdes så rene som muligt under testen, så koncentrationen af organisk kulstof er så lav som mulig, eftersom tilstedeværende organisk kulstof kan nedsætte teststoffets biotilgængelighed (1).

Da meget foder er fremstillet af fiskemel, må det analyseres for teststoffet. Foderet bør tillige analyseres for pesticider og tungmetaller.

1.8.2.6. Lys og temperatur

Lysperioden er normalt 12-16 timer, og temperaturen (± 2 °C) skal være afpasset efter testfiskearten (se bilag 2). Belysningens type og karakteristika skal være kendt. Man bør være opmærksom på en eventuel fotokemisk omdannelse af teststoffet ved belysningsforholdene under undersøgelsen. Der skal benyttes en passende belysning, hvor det undgås, at fiskene udsættes for kunstigt fremkaldte fotokemiske omdannelsesprodukter. Det kan i nogle tilfælde være hensigtsmæssigt at afblænde UV-stråling under 290 nm med et filter.

1.8.2.7. Testkoncentrationer

Fiskene udsættes under gennemstrømning for mindst to koncentrationer af teststoffet i vand. Normalt sættes den højeste koncentration af teststoffet til ca. 1 % af den akutte asymptotiske LC_{50}og mindst ti gange højere end påvisningsgrænsen i vand ved den anvendte analysemetode.

De højeste testkoncentration kan også fastsættes ved division af den akutte 96h LC_{50} med et passende akut/kronisk-forhold (for nogle kemiske stoffer vil et passende forhold ligge fra ca 3 op til 100). Om muligt vælges den eller de andre testkoncentrationer, således at den (de) er en faktor ti lavere. Kan det ikke lade sig gøre på grund af 1 % af LC_{50}-kriteriet og analysegrænsen, kan der benyttes en mindre faktor, eller man kan overveje at benytte ^{14}C-mærket teststof. Der må ikke benyttes koncentrationer højere end teststoffets opløselighed.

Hvis der benyttes et opløsende stof, må koncentrationen ikke være større end 0,1 ml/l, og den skal være den samme i alle testkar. Dette stofs og teststoffets bidrag til det samlede indhold af organisk kulstof i testvandet skal være kendt. Det skal dog så vidt muligt undgås at benytte sådanne materialer.

1.8.2.8. Kontrolgrupper

Der skal ud over testrækken være en kontrolgruppe med fortyndingsvand eller en kontrolgruppe med et eventuelt opløsende stof, forudsat at det er fastslået, at det opløsende stof ikke har nogen virkning på fisk. Er det ikke tilfældet, skal begge kontrolgrupper forefindes.

1.8.3. *Hyppighed af målinger af vandkvaliteten*

Under testen måles opløst oxygen, TOC, pH og temperatur i alle kar. I kontrolkarrene og karret med den højeste koncentration måles vandets samlede hårdhed og saltholdighed, hvis det er relevant. Som minimum måles opløst oxygen og eventuel saltholdighed tre gange — ved begyndelsen, midt i og ved slutningen af optagelsesperioden — og en gang ugentligt i udskillelsesperioden. TOC måles ved testens begyndelse (24 h og 48 h før optagelsesfasen begynder), for fiskene overføres, og mindst en gang ugentligt under både optagelses- og udskillelsesfasen. Temperaturen måles dagligt, pH ved begyndelsen og slutningen af hver periode, og hårdheden én gang ved hver test. Temperaturen skal helst følges kontinuerligt i mindst ét at karrene.

1.8.4. *Prøveudtagning og analyse af fisk og vand*

1.8.4.1. Plan for udtagning af prøver af fisk og vand

Der udtages prøver af vandet fra testkamrene med henblik på bestemmelse af teststofkoncentrationen, både inden fiskene overføres og under optagelses- og udskillelsesfasen. Som minimum udtages der prøver af vandet samtidig med prøver af fisk og før fodring. Under optagelsesfasen bestemmes teststofkoncentrationen til kontrol af, at gyldighedskriterierne er opfyldt.

Der udtages prøver af fisk mindst fem gange under optagelsesfasen og mindst fire gange under udskillelsesfasen. Da det i nogle tilfælde vil være vanskeligt at beregne et rimelig præcist skøn over BCF-værdien ud fra dette prøveantal, især hvis det formodes, at udskillelsen ikke følger en simpel førsteordenskinetik, kan det anbefales at øge prøveudtagningshyppigheden i begge perioder (se bilag 4). De ekstra prøver opbevares og analyseres kun, hvis resultaterne af den første analyserunde viser sig utilstrækkelig til beregning af BCF med den ønskede præcision.

I bilag 4 er der vist et eksempel på en acceptabel prøveudtagningsplan. Der kan let opstilles andre planer efter beregning af eksponeringstider for 95 % optagelse ud fra andre antagne P_{ow}-værdier.

Prøveudtagningen fortsættes under optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 28 dage. Er der ikke nået ligevægt inden for 28 dage, fortsættes prøveudtagningen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 60 dage. Før udskillelsesfasen overføres fiskene til rene kar.

1.8.4.2. Udtagning og forberedelse af prøver

Vandprøver til analyse kan f.eks. udtages ved opsugning gennem et rør af inert materiale fra et sted midt i testkammeret. Da hverken filtrering eller centrifugering synes at kunne adskille den ikke-biotilgængelige fraktion af teststoffet fra den biotilgængelige (især for ekstremt lipofile stoffer, dvs. stoffer med log $P_{ow} > 5$) (1) (5) i alle tilfælde, må prøverne ikke behandles på denne måde.

I stedet må man sørge for at holde karrene så rene som muligt, og indholdet af organisk kulstof i alt følges under såvel optagelses- som udskillelsesfasen.

Der udtages et passende antal fisk (normalt mindst fire) fra testkarrene ved hver prøveudtagning. De udtagne fisk skylles hurtigt med vand, duppes tørre og aflives med det samme på den mest velegnede og humane måde, hvorefter de vejes.

Fiske- og vandprøver skal helst analyseres umiddelbart efter udtagningen, så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og udskillelseshastigheder. Ved at foretage analyserne med det samme opdager man straks, når et plateau er nået.

Foretages analyserne ikke med det samme, opbevares prøverne hensigtsmæssigt. Inden undersøgelsen påbegyndes, indhentes der oplysninger om, hvordan det pågældende teststof bør opbevares, feks. dybfrysning, henstand ved 4 °C, opbevaringstid og ekstraktion.

1.8.4.3. Analysemetodens kvalitet

Da hele proceduren i vid udstrækning afhænger af analysemetodens nøjagtighed, præcision og følsomhed, kontrolleres det eksperimentelt, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfinding af teststoffet i både vand og fisk for den valgte metode. Det kontrolleres tillige, at teststoffet ikke kan påvises i det anvendte fortyndingsvand.

Om nødvendigt korrigeres de under testen funde C_w- og C_f-værdier for genfinding og baggrundsværdier i kontrolgrupperne. Fiske- og vandprøver håndteres hele tiden på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. ved adsorption i prøveudtagningsudstyret) er mindst mulige.

1.8.4.4. Analyse af fiskeprøver

Hvis der i testen anvendes radioaktivt mærket materiale, kan man analysere for det samlede indhold af radioaktivitet (dvs. det oprindelige stof og dets metabolitter), eller prøverne kan oprenses, så den oprindelige forbindelse kan analyseres særskilt. Også de vigtigste metabolitter kan karakteriseres ved ligevægtstilstanden eller ved afslutningen af optagelsesfasen, hvis den nås først. Hvis BCF udtrykt som samlet mængde radioaktivt mærket materiale er ≥ 1 000 % tilrådes det — for visse stoffers, f.eks. pesticiders, vedkommende henstilles det kraftigt — at nedbrydningsprodukter, der udgør ≥ 10 % af restindholdet i alt i fiskevævet ved ligevægt, identificeres og bestemmes kvantitativt. Hvis nedbrydningsprodukter, der udgør ≥ 10 % af radioaktivt mærket restindhold i alt i fiskevævet, identificeres og bestemmes kvantitativt, anbefales det at gøre det samme for nedbrydningsprodukter i testvandet.

Normalt skal koncentrationen af teststoffet bestemmes i hver enkelt fisk efter vejning. Er det ikke muligt, kan prøverne fra hver prøveudtagning pooles, men pooling indskrænker mulighederne for statistisk behandling af dataene. Hvis en bestemt statistisk metode og styrke er vigtige hensyn, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange fisk til, at den ønskede pooling og styrke tilgodeses (6) (7).

BCF udtrykkes både som funktion af samlet våd vægt og — for stærkt lipofile stoffer — som funktion af fedtindholdet. Fiskenes fedtindhold bestemmes om muligt ved hver prøveudtagning. Bestemmelsen af fedtindholdet skal bestemmes ved hjælp af egnede metoder (reference 8 og 2 i bilag 3). Som standardmetode kan ekstraktion med chloroform/methanol anbefales (9). Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier (10), er det vigtigt at give nærmere oplysninger om, hvilken metode der er benyttet. Når det er muligt, skal lipidanalysen foretages på samme ekstrakt, som er benyttet til analyse for teststoffet, eftersom lipiderne ofte må fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved gaskromatografi. Forskellen mellem fiskenes fedtindhold (i mg pr. kg våd vægt) ved begyndelsen af eksperimentet og ved slutningen må ikke være større end ± 25 %. Også vævets tørstofindhold skal oplyses, så lipidkoncentrationen kan omregnes fra våd basis til tørstofbasis.

2. DATA

2.1. Behandling af resultater

Teststoffets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i/på fiskene (eller bestemt væv) under optagelsesfasen mod tiden (lineære akser). Hvis kurven viser et plateau, dvs. at den er omtrent parallel med tidsaksen, beregnes ligevægtsværdien BCF_{SS} ved hjælp af udtrykket

$$\frac{C_f \text{ i ligevægt (gennemsnit)}}{C_w \text{ i ligevægt (gennemsnit)}}$$

Hvis der ikke opnås ligevægt, kan der beregnes en BCF_{SS}-værdi, der er tilstrækkelig nøjagtig til risikovurderingsformål, ud fra en »stationær tilstand« ved 80 % ($1{,}6/k_2$) eller 95 % ($3{,}0/k_2$) af ligevægt.

Også biokoncentreringsfaktoren BCF_k beregnes som forholdet k_1/k_2, de to førsteordens hastighedskonstanter. Hastighedskonstanten for udskillelse (k_2) bestemmes normalt ud fra udskillelseskurven (dvs. en afbildning af faldet i teststoffets koncentration i fiskene mod tiden). Dernæst beregnes hastighedskonstanten for optagelse (k_1) på grundlag af k_2 og en værdi af C_f, som udledes af optagelseskurven (se også bilag 5). Til at finde BCF_k og hastighedskonstanterne k_1 og k_2 foretrækkes ikke-lineære parameterestimeringsmetoder på computer (11). Ellers kan der benyttes grafiske metoder til beregning af k_1 og k_2. Hvis udskillelseskurven tydeligvis ikke er af første orden, må der tages mere komplekse modeller i brug (se referencerne i bilag 3) og søges biostatistisk bistand.

2.2. Fortolkning af resultater

Hvis der i prøveopløsninger måles koncentrationer nær analysemetodens påvisningsgrænse, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed.

Skarpe optagelses- og udskillelseskurver er tegn på biokoncentreringsdata af høj kvalitet. Forskellen mellem optagelses- og udskillelseskonstanterne ved to testkoncentrationer bør være mindre end 20 %. Hvis der iagttages signifikante forskelle i optagelses- og udskillelseskonstanter mellem de to anvendte testkoncentrationer, skal dette noteres og forsøges forklaret. Normalt ligger konfidensgrænserne for BCF-værdier i vel tilrettelagte undersøgelser omkring ± 20 %.

3. RAPPORTERING

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

3.1. Teststof

— dets fysiske tilstandsform og relevante fysiske og kemiske egenskaber

— data til kemisk identifikation (herunder et eventuelt indhold af organisk kulstof)

— hvis stoffet er radioaktivt mærket, de mærkede atomers nøjagtige position og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder.

3.2. Testart

— dens videnskabelige navn, stamme, kilde, eventuel forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse, mv.

3.3. Testbetingelser

— testprocedure (f.eks. gennemstrømning eller semistatisk)

— belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed

— testens tilrettelægning (f.eks. testkamrenes antal og størrelse, vandudskiftningsrate, antal gentagelser, antal fisk pr. gentagelse, antal testkoncentrationer, optagelses- og udskillelsesfasens længde samt udtagningshyppighed for fiske- og vandprøver)

— metode til fremstilling af stamopløsninger og fornyelseshyppighed (hvis der er benyttet et opløsende stof, oplyses dets koncentration og dets bidrag til testvandets indhold af organisk kulstof)

— de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testkarrene samt, hvilken metode der er benyttet til bestemmelsen

— kilde til fortyndingsvand, beskrivelse af en eventuel forbehandling, resultater af forsøg til bekræftelse af, at fisk kan leve i vandet, samt vandets parametre: pH, hårdhed, temperatur, koncentration af opløst oxygen, restchlorindhold (hvis bestemt), organisk kulstof i alt, opslæmmet tørstof, testmediets saltholdighed (hvis relevant) samt alle andre foretagne målinger

— kvaliteten af vandet i testkarrene, pH, hårdhed, TOC, temperatur og koncentration af opløst oxygen

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type, kilde og sammensætning (i hvert fald fedt- og proteinindhold) samt fodermængde og fodringshyppighed)

— oplysninger om, hvordan fiske- og vandprøver er behandlet, herunder forberedelse, opbevaring, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for teststof og fedtindhold (hvis bestemt).

3.4. Resultater

— resultater af eventuelle indledende undersøgelser

— dødelighed for kontrolfiskene og fiskene i de enkelte testkamre samt eventuelt iagttaget unormal adfærd

— fiskenes fedtindhold (hvis bestemt i forbindelse med testen)

— kurver (og alle måledata), der viser optagelse og udskillelse af teststoffet i fiskene, samt tiden til ligevægt

— C_f og C_w (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) for alle udtagne prøver (C_f anføres i µg pr. g våd vægt (ppm), enten legemsvægt eller vægt af et bestemt væv, f.eks. fedtvæv, og C_w µg/ml (ppm)); C_w-værdier for kontrolgruppen (også baggrundsværdier oplyses)

— ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren (BCF_{SS}) og/eller den kinetiske koncentreringsfaktor (BCF_K) og i relevante tilfælde 95 % konfidensgrænser for hastighedskonstanter for optagelse og udskillelse (alle udtrykt i forhold til fiskenes legemsvægt eller fiskenes eller de specificerede vævs fedtindhold), konfidensgrænser og standardafvigelse (hvis de foreligger samt beregnings- og dataanalysemetoder for hver koncentration af teststof

— hvis der er benyttet radioaktivt mærkede stoffer, kan en eventuel akkumulering af påviste metabolitter anføres, hvis det er påkrævet

— alle usædvanlige omstændigheder ved testen, eventuelle afvigelser fra proceduren samt alle andre relevante oplysninger.

Resultater som »ikke påvist ved påvisningsgrænsen« bør ved forudgående metodeudvikling og god tilrettelæggelse af forsøget være indskrænket til et minimum, da sådanne resultater ikke kan benyttes til beregning af hastighedskonstanter.

4. REFERENCER

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 117-156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No 3.

(4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in »The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation«, Ch. 2.3, Part II. Government Publisching Office, The Hague, The Netherlands.

(9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431-1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTME E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fisches and Saltwater Bivalve Molluscs.

Bilag 1

Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding

	Stof	Koncentrationsgrænse
1	Partikler	5 mg/l
2	Organisk kulstof i alt	2 mg/l
3	Ikke-ionisseret ammoniak	1 µg/l
4	Restchlor	10 µg/l
5	Organophosphorpesticider i alt	50 ng/l
6	Organochlorpesticider i alt plus polychlorerede biphenyler	50 ng/l
7	Organisk chlor i alt	25 ng/l
8	Aluminium	1 µg/l
9	Arsen	1 µg/l
10	Chrom	1 µg/l
11	Cobalt	1 µg/l
12	Kobber	1 µg/l
13	Jern	1 µg/l
14	Bly	1 µg/l
15	Nikkel	1 µg/l
16	Zink	1 µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Kviksølv	100 ng/l
19	Sølv	100 ng/l

Bilag 2

Anbefalede testfiskearter

	Anbefalet art	Anbefalet testtemperaturinterval (°C)	Anbefalet størrelse af testfisk (længde i cm)
1	Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) zebrafisk	20-25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20-25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpe	20-25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) japansk risfisk	20-25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) guppy	20-25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque)	20-25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) regnbueørred	13-17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) trepigget hundestejle	18-20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

I forskellige lande benyttes der en række brakvands- og saltvandsarter, f.eks.

Trommefisk	Leiostomus xanthurus
»Sheepshead minnow«	Cyprinodon variegatus
Stribefisk	Menidia beryllina
»Shiner perch«	Cymatogaster aggregata
»English sole«	Parophrys vetulus
»Staghjorn sculpin«	Leptocottus armatus
Trepigget hundestejle	Gasteroteus aculeatus
Havaborre	Dicentracus labrax
Løje	Alburnus alburnus

Samling

De i ovenstående tabel opregnede ferskvandsfisk er lette at opdrætte og/eller fremskaffe hele året, mens saltvands- og brakvandsarterne til dels kun findes i bestemte lande. De kan opdrættes enten i fiskefarme eller i laboratoriet under kontrollerede forhold med hensyn til sygdomme og parasitter, så testdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk kan fås over det meste af verden.

Bilag 3

Forudsigelse af længden af optagelsesfasen og udskillelsesfasen

1. *Forudsigelse af optagelsesfasens længde*

Før testen udføres, kan man ud fra en empirisk sammenhæng mellem k_2 og n-octanol/vand fordelingskoefficienten (P_{OW}) eller k_2 og opløseligheden i vand (s) foretage et skøn over k_2 og dermed en procentdel af den tid, der vil være påkrævet til at nå ligevægt.

Eksempelvis kan k_2 (dag^{-1}) skønnes ved hjælp af følgende empiriske udtryk (1):

$$\log_{10}k_2 = -0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47 \quad (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{(ligning 1)}$$

Andre udtryk, se reference (2).

Hvis fordelingskoefficienten ikke er kendt, kan denne skønnes (3) ud fra stoffets opløselighed i vand (s) ifølge udtrykket:

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10}(s) + 0{,}710 \quad (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{(ligning 2)}$$

hvor s = opløseligheden (mol/l) : (n = 36)

Disse sammenhænge gælder kun for stoffer med log P_{ow}-værdier mellem 2 og 6,5 (4).

Den tid, der går til en bestemt procent af ligevægt, kan beregnes ud fra det generelle udtryk, der beskriver optagelses- og udskillelseskinetikken (førsteordenskinetik) ved at anvende k_2-skønnet:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1.C_w - k_2.C_f$$

eller hvis C_w er konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(ligning 3)}$$

Når der er næsten ligevægt ($t \rightarrow \infty$), kan ligning 3 reduceres til (5) (6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{eller} \quad C_f/C_w = k_1/k_2 = BCF$$

Da er $k_1/k_2 \cdot C_W$ en tilnærmelse til koncentrationen i fiskene ved »ligevægt« (C_{fs}).

Ligning 3 kan omskrives til:

$$C_f = C_{fs}(1\text{-}e^{-k_2 t}) \quad \text{eller} \quad \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(ligning 4)}$$

Ved at anvende ligning 4 kan man forudsige, hvor lang tid der går indtil en vis procent af ligevægt er nået, når k_2 allerede er skønnet ved hjælp af ligning 1 eller 2.

Som rettesnor kan anføres, at den statistisk optimale længde af optagelsesfasen, når der ønskes statistisk acceptable data (BCF_s), er den tid, der går, indtil kurven over logaritmen til koncentrationen af teststoffet i fiskene mod tiden har nået sit midtpunkt, dvs. ved $1{,}6/k_2$ svarende til 80 % ligevægt, men ikke over $3{,}0/k_2$ svarende til 95 % ligevægt (7).

Den tid, der går indtil 80 % ligevægt, er (ligning 4):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{eller} \quad t_{80} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{(ligning 5)}$$

Tilsvarende for 95 % ligevægt:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(ligning 6)}$$

For eksempel vil optagelsesfasens længde (up) for et teststof med log $P_{ow} = 4$ være (ligning 1, 5 og 6):

$\log_{10} k_2 = -0,414\ (4) + 1,47 \qquad k_2 = 0,652\ \text{dag}^{-1}$

up (80 %) = 1,6/0,652, dvs. 2,45 dag (59 timer)

eller up (95 %) = 3,0/0,652, dvs. 4,60 dag (110 timer)

Tilsvarende vil optagelsestiden for et teststof med $s = 10^{-5}$ mol/l (log $s = -5,0$) være (ligning 1, 2, 5 og 6):

$\log_{10} (P_{ow}) = -0,862\ (-5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10} k_2 = -0,414\ (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246\ \text{dag}^{-1}$

up (80 %) = 1,6/0,246, dvs. 6,5 dage (156 timer)

eller up (95 %) = 3,0/0,246, dvs. 12,2 dage (293 timer)

Alternativt kan udtrykket:

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3}\ P_{ow} + 55,31 \text{ (timer)}$$

benyttes til beregning af, hvor lang tid der går til faktisk ligevægt (4).

2. *Forudsigelse af udskillelsesfasens længde*

Ud fra det generelle udtryk, der beskriver optagelses- og udskillelseskinetikken (førsteordenskinetik), kan man ligeledes forudsige, hvor lang tid der kræves for, at legemsbelastningen falder til en vis procentdel af begyndelseskoncentrationen (1) (8).

I udskillelsesfasen antages C_w at være nul. Udtrykket kan da reduceres til:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \qquad \text{eller} \qquad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

hvor $C_{f,o}$ er koncentrationen ved udskillelsesperiodens begyndelse. 50 % udskillelse vil da være nået til tidspunktet (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \qquad \text{eller} \qquad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Tilsvarende vil 95 % udskillelse være nået ved:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Hvis der i den første periode benyttes 80 % optagelse ($1,6/k_2$), og der i udskillelsesfasen benyttes 95 % tab ($3,0/k_2$), bliver udskillelsesfasen omtrent dobbelt så lang som optagelsesfasen.

Det er vigtigt at bemærke, at skønnene er baseret på antagelsen om førsteordenskinetik for optagelse og udskillelse. Er denne forudsætning tydeligvis ikke opfyldt, må der tages mere komplekse modeller i brug (f.eks. reference 1).

Litteratur (til bilag 3)

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp 309-320.

(2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.

(6) Ernst W. (1985) Accumulation in aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. (red) Part 4.4, pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kenetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19.

Bilag 4

Teoretisk eksempel på prøveudtagningsplan for biokoncentreringstest af stoffer med log P_{ow} = 4

Fiskeprøve	Tidspunkt for prøveudtagningen		Antal vandprøver	Antal fisk pr. prøve
	Mindste hyppighed (dage)	Supplerende prøve		
Optagelsesfasen	– 1 0		2 (*) 2	Tilførsel af 45-80 fisk
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Udskillelsesfasen				Fiskene overføres til vand uden teststof
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

(*) Der udtages vandprøve efter aftapning af mindst tre kammerrumfang vand.

Tallene i parentes angiver, hvor mange prøver (vand, fisk) der skal udtages, hvis der foretages supplerende prøveudtagning.

Anmærking: Forud for testen er k_2 for en log P_{ow} på 4,0 skønnet til 0,652 dag^{-1}. Forsøgets samlede varighed sættes til 3 × up = 3 × 4,6 dage, dvs. 14 dage. For skøn af »up« henvises der til bilag 3.

Bilag 5

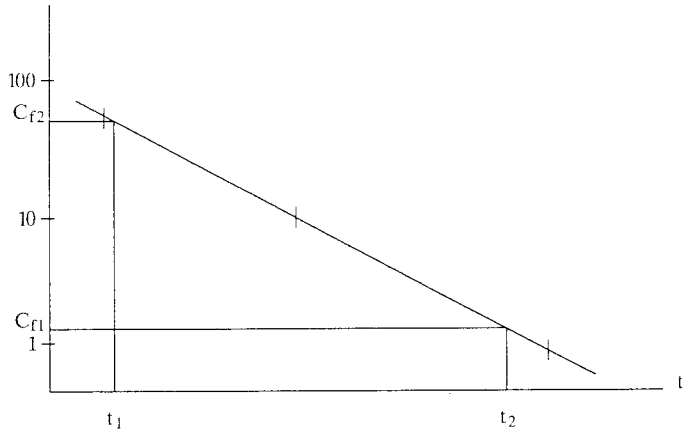
Modelvalg

De fleste biokoncentreringsdata antages at kunne beskrives »rimelig« godt ved en simpel model med to dele (»compartments«) og to parametre, hvilket fremgår af den bedste retlinede kurve gennem punkterne for koncentrationen i fisk under udskillelsesfasen, når de afsættes på semilogaritmisk papir. (Hvis punkterne ikke kan beskrives ved en ret linje, må der benyttes mere komplekse modeller, se f.eks. Spacie og Hamelinck, reference 1 til bilag 3).

Grafisk metode til bestemmelse af hastighedskonstanten for udskillelse, k_2

Koncentrationen af teststoffet i hver fiskeprøve afbildes mod tiden på semilogaritmisk papir. Linjen har hældningen k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1} / C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Det skal bemærkes, at afvigelser fra en ret linje kan tyde på, at udskillelsens kinetik er mere kompleks end første orden. Der kan benyttes en grafisk metode til løsning af udskillelse, der ikke har af førsteordens kinetik.

Grafisk metode til bestemmelse af hastighedskonstanten for optagelse, k_1

På grundlag af k_2 beregnes k_1 efter udtrykket

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(ligning 1).}$$

Værdien af C_f aflæses ved midtpunktet af den glatte optagelseskurve fra afbildningen af logaritmen til koncentrationen mod tiden (lineært).

Computermetode til bestemmelse af hastighedskonstanterne for optagelse og udskillelse

Til bestemmelse af biokoncentreringsfaktoren og hastighedskonstanterne k_1 og k_2 foretrækkes det, at der benyttes ikke-lineære estimeringsmetoder på computer. Sådanne programmer finder værdier for k_1 og k_2 ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og følgende model:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ligning 2)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(ligning 3)}$$

hvor t_c er tidspunktet for afslutningen af optagelsesfasen.

Denne metode giver skøn over standardafvigelser for k_1 og k_2.

Eftersom k_2 i de fleste tilfælde kan skønnes ud fra udskillelseskurven med forholdsvis stor præcision, og der er en stærk korrelation mellem de to parametre k_1 og k_2, hvis skønnet samtidigt, er det undertiden bedst først at beregne k_2 ud fra udskillelsesdataene alene og derefter at beregne k_1 ud fra optagelsesdataene ved hjælp af ikke-lineær regression.

C.14. VÆKSTTEST PÅ FISKEYNGEL

1. METODE

Denne væksttoksicitets-testmetode svarer til OECD TG 215 (2000).

1.1. INTRODUKTION

Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på væksten hos fiskeyngel, som gennem længere tid eksponeres for kemikalier. Testen er baseret på en metode, som er udviklet og ring-testet (1)(3) inden for den Europæiske Union med henblik på at vurdere virkningerne af kemikalier på væksten hos yngel af regnbueørred (Oncorhynchus mykiss) under gennemstrømningsbetingelser. Andre veldokumenterede arter kan anvendes. For eksempel har man erfaring fra vækstest med zebrafisk (Danio rerio) (2)(4)(5) og riskarpe (medaka, Oryzias latipes) (6)(7)(8).

Der henvises også til den generelle indledning til del C.

1.2. DEFINITIONER

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en signifikant virkning ($p < 0,05$) i sammenligning med en kontrolgruppe. Dog skal alle testkoncentrationer over LOEC have en skadevirkning, som er lig med eller større end de virkninger, der er observeret ved LOEC.

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

EC_x er ved denne testmetode den koncentration af testkemikaliet, som forårsager en variation i fiskenes tilvækst på x % i sammenligning med kontrolgrupperne.

Belastningsgraden er fiskenes vådvægt pr. vandvolumen.

Bestandtætheden er antallet af fisk pr. vandvolumen.

Enkeltfisk-specifik tilvækst er et udtryk for en enkelt fisks tilvækst på grundlag af fiskens startvægt.

Beholdergennemsnits-specifik tilvækst er et udtryk for den gennemsnitlige tilvækst for en beholderpopulation ved én koncentration.

Pseudo-specifik tilvækst er et udtryk for den enkelte fisks tilvækst i sammenligning med beholderpopulationens gennemsnitlige startvægt.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Fiskeyngel i den eskponentielle vækstfase vejes og anbringes derefter i testbeholdere og eksponeres for en række subletale koncentrationer af testkemikaliet opløst i vand, fortrinsvis ved gennemstrømning eller, hvis dette ikke er muligt, under passende semistatiske betingelser (statisk-udskiftning). Testens varighed er 28 dage. Fiskene fodres dagligt. Foderrationen baseres på fiskenes startvægt og kan genberegnes efter 14 dage. Ved testens afslutning vejes fiskene igen. Virkningerne på tilvæksten analyseres ved anvendelse af en regressionsmodel for at beregne den koncentration, som ville forårsage en variation i tilvæksten på x %, dvs. EC_x (f.eks. EC_{10}, EC_{20} eller EC_{30}). Alternativt kan dataene sammenlignes med kontrolværdierne for at bestemme den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og derudfra koncentrationen uden observeret effekt (NOEC).

1.4. INFORMATION OM TESTKEMIKALIET

Der bør foreligge resultater fra en akut-toksicitetstest (se testmetode C.1), fortrinsvis udført på den art, som er valgt til denne test. Dette indebærer, at testkemikaliets vandopløselighed og damptryk er kendt, og at der foreligger en pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsningerne med kendt og rapporteret nøjagtighed, samt en detektionsgrænse.

Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, kemikaliets renhed, vand- og lysstabilitet, pK_a, P_{ow} samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (se testmetode C.4).

1.5. TESTENS VALIDITET

Testens validitet forudsætter følgende:

— mortaliteten i kontrolgruppen/-erne må ikke overstige 10 % ved testens afslutning

— den gennemsnitlige vægt af fiskene i kontrolgruppen/-erne skal være øget tilstrækkeligt til, at detektion af den minimale variation i tilvæksten kan betragtes som signifikant. En ring-test (3) har vist, at for regnbueørreders vedkommende skal gennemsnitsvægten for fiskene i kontrolgrupperne i løbet af 28 dage være øget med mindst det halve (dvs. 50 %) af deres gennemsnitlige startvægt; f.eks. startvægt: 1 g/fisk (= 100 %), slutvægt efter 28 dage: ≥ 1,5 g/fisk (≥ 150 %)

— koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele testperioden have været mindst 60 % af værdien for luftmætning (ASV)

— vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i løbet af testen variere med mere end 1 °C mellem testbeholderne og skal holdes inden for 2 °C omkring de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (tillæg 1).

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

a) ilt- og pH-måleudstyr

b) udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet

c) egnet apparatur til temperaturkontrol og fortrinsvis kontinuerlig overvågning

d) beholdere fremstillet af et kemisk inaktivt materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se afsnit 1.8.5 og tillæg 1);

e) vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på ± 0,5 %).

1.6.2. **Vand**

Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. Vandets pH skal ligge inden for området fra 6,5 til 8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et område på ± 0,5 pH-enheder. En hårdhedsgrad på over 140 mg/l (som $CaCO_3$) anbefales. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikaliet), skal der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4), pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmet tørstof skal foretages, f.eks. hver 3. måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant gennem mindst ét år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med længere intervaller (f.eks. hver 6. måned). I tillæg 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

1.6.3. **Testopløsninger**

Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Mætningssøjler (opløselighedssøjler) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen.

Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler (opløselighedsfremmere) kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Eksempler på egnede opløsningsmidler er acetone, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid og triethylenglycol. Eksempler

på egnede dispergeringsmidler er Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Man skal udvise forsigtighed ved anvendelse af stoffer, der er umiddelbart biologisk nedbrydelige (f.eks. acetone) og/eller meget flygtige, idet de ved gennemstrømningstest kan give anledning til problemer med bakteriebelægninger. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, må dette ikke have nogen signifikant virkning på fiskenes vækst eller synlig negativ virkning på fiskeyngelen, hvilket kan afsløres ved en kontroltest, hvor kun opløsningsmidlet anvendes.

Til gennemstrømningstest kræves et system, som kontinuerligt doserer og fortynder en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en række forskellige koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En ring-test (3) har vist, at en vandudskiftningshyppighed på 6 l pr. g fisk pr. døgn i løbet af testen er passende for regnbueørreds vedkommende (se afsnit 1.8.2.2).

Til semistatiske (udskiftnings-) test vil medieudskiftningshyppigheden være afhængig af testkemikaliets stabilitet; men det anbefales at udskifte vandet hver dag. Hvis det på baggrund af præliminære stabilitetstest (se afsnit 1.4) har vist sig, at testkemikaliets koncentration ikke er stabil (dvs. ligger uden for området på 80-120 % af den nominelle værdi, eller under 80 % af den målte startkoncentration) i udskiftningstidsrummet, bør man overveje at anvende en gennemstrømningstest.

1.6.4. Valg af fiskeart

Regnbueørred (Oncorhynchus mykiss) er den anbefalede art til denne test, idet man har mest erfaring fra ringtest med denne art (1)(3). Andre veldokumenterede arter kan dog anvendes; men testproceduren må eventuelt tilpasses, så man opnår de bedst egnede testbetingelser. For eksempel har man også erfaring med zebrafisk (Danio rerio) (4)(5) og riskarpe (medaka, Oryzias latipes) (6)(7)(8). En begrundelse for valget af art og testmetode skal i så fald anføres.

1.6.5. Opbevaring af fiskene

Testfiskene skal udvælges fra en population af en enkelt bestand, fortrinsvis fra samme gydning, som i mindst to uger forud for testen holdes under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Fiskene skal fodres med en minimumsration på 2 % af kropsvægten pr. dag, og fortrinsvis 4 % af kropsvægten pr. dag, gennem hele opbevaringsperioden og under testen.

Efter en akklimatiseringsperiode på 48 timer registreres mortaliteten, og følgende kriterier bringes i anvendelse:

— mortalitet på mere end 10 % af populationen på syv dage: hele fiskegruppen kasseres

— mortalitet på mellem 5 % og 10 % af populationen: akklimatisering i yderligere syv dage, og hvis mortaliteten er over 5 % i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen

— mortalitet på mindre end 5 % af populationen på syv dage: fiskegruppen godkendes.

I de to uger forud for testen eller under testen bør fiskene ikke behandles for sygdomme.

1.7. TESTDESIGN

»Testdesignet« vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal beholdere med hvert koncentrationsniveau samt antal fisk pr. beholder. Optimalt bør testedesignet vælges under hensyntagen til:

a) undersøgelsens formål

b) den anvendte statistiske analysemetode

c) forsøgsressourcernes tilgængelighed og pris.

Beskrivelsen af formålet bør, om muligt, angive den statistiske opløsningsgrad, ved hvilken en given forskelsstørrelse (f.eks. i tilvækst) skal detekteres, eller alternativt den nøjagtighed, hvormed EC_x (f.eks. hvor x = 10, 20 eller 30, og fortrinsvis ikke mindre end 10) skal beregnes. Dette er en forudsætning for, at undersøgelsens omfang kan fastlægges med sikkerhed.

Det er vigtigt at forstå, at et design, som er optimalt (giver den bedste udnyttelse af ressourcerne) til brug i forbindelse med én statistisk analysemetode, ikke nødvendigvis er optimalt ved en anden metode. Det design, der anbefales til vurdering af LOEC/NOEC, vil derfor ikke være det samme som det, der anbefales til brug ved regressionsanalyse.

I de fleste tilfælde foretrækkes regressionsanalyse frem for variansanalyse, af årsager, som Stephan og Rogers (9) har gjort rede for. Hvor der imidlertid ikke foreligger nogen egnet regressionsmodel, bør ($r^2 < 0,9$) NOEC/LOEC anvendes.

1.7.1. Design for regressionsanalyse

Følgende punkter er vigtige at tage i betragtning, når en test skal designes til regressionsanalyse:

a) Testen må nødvendigvis omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. $EC_{10,20,30}$) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer vil være mest nøjagtig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. En præliminær test til bestemmelse af dette område kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende.

b) For at man skal kunne opstille en fyldestgørende statistisk model, skal testen omfatte mindst én kontrolbeholder og fem yderligere beholdere med forskellige koncentrationer. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, og hvor det er aktuelt, bør der i tillæg til testrækken udføres en test på én kontrolbeholder indeholdende opløselighedsfremmeren i den højeste testkoncentration (se afsnit 1.8.3 og 1.8.4).

c) En passende geometrisk eller logaritmisk progression (10) (se tillæg 3) kan anvendes. Logaritmiske progressioner mellem testkoncentrationerne er at foretrække.

d) Hvis man har mere end seks beholdere til rådighed, bør de ekstra beholdere enten anvendes til replikation eller fordeles inden for koncentrationsområdet, så der bliver mulighed for mindre intervaller mellem niveauerne. Disse to muligheder er lige ønskelige.

1.7.2. Design for vurdering af NOEC/LOEC ved anvendelse af variansanalyse (ANOVA)

Fortrinsvis bør der være replikatbeholdere for hver enkelt koncentration, og statistiske analyser bør foretages på beholderniveau (11). Hvis man ikke har replikat-beholdere, kan man ikke tage højde for variabiliteten mellem beholdere ud over, hvad der må tilskrives enkeltfisk. Man har imidlertid erfaret (12), at variabiliteten mellem beholdere har været meget lille i sammenligning med variabiliteten inden for beholderen (dvs. mellem enkeltfisk) i det undersøgte tilfælde. Det er derfor et relativt acceptabelt alternativ at udføre statistisk analyse på enkeltfisk-niveau.

Normalt anvendes mindst fem testkoncentrationer i en geometrisk progression med en faktor, som ikke overstiger 3,2.

Når testene udføres med replikat-beholdere, bør antallet af replikat-kontrolbeholdere, og dermed antallet af fisk, almindeligvis være det dobbelte for hver af testkoncentrationerne, som bør omfatte samme antal (13)(14)(15). Hvis man derimod ikke har replikat-beholdere, bør der være lige så mange fisk i kontrolgruppen som i hver af testkoncentrationerne.

Hvis ANOVA skal baseres på beholdere i stedet for enkeltfisk (hvilket vil indebære enten, at hver enkelt fisk skal mærkes, eller anvendelse af »pseudo«-specifik tilvækst (se afsnit 2.1.2)), vil det være nødvendigt med tilstrækkeligt mange replikat-beholdere til, at standardafvigelsen for »beholdere inden for koncentrationerne« kan bestemmes. Dette betyder, at fejlfrihedsgraden i variansanalysen bør være mindst fem (11). Hvis kun kontrolgrupperne replikeres, vil der være en risiko for skævhed i fejlvariabiliteten, idet denne kan stige, når middelværdien for den pågældende tilvækst stiger. Eftersom det er sandsynligt, at tilvæksten vil falde, når koncentrationen øges, vil dette give en tilbøjelighed til overvurdering af variabiliteten.

1.8. FREMGANGSMÅDE

1.8.1. Udvælgelse og vejning af testfisk

Det er vigtigt at minimere variationen i fiskenes vægt ved testens begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test, er angivet i tillæg 1. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for individuel vægt ved testens begyndelse ideelt bør holdes inden for ± 10 % af

gennemsnitsvægten og må under ingen omstændigheder overstige 25 %. Det anbefales at veje en delprøve af fisk inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

Stampopulationen bør ikke fodres i 24 timer forud for testens begyndelse. Derpå bør fiskene vælges tilfældigt. Ved anvendelse af et totalbedøvende middel (f.eks. en vandig opløsning af 100 mg/l tricainmethansulfonat (MS 222) neutraliseret ved tilsætning af to dele natriumbicarbonat pr. del MS 222) bør fiskene vejes enkeltvis som vådvægt (duppes tørre) med den nøjagtighed, som er anført i tillæg 1. De fisk, hvis vægt ligger inden for det ønskede område, tages fra og fordeles derpå tilfældigt mellem testbeholderne. Den samlede vådvægt af fisk i hver testbeholder registreres. Både anvendelsen af bedøvelsesmidlet og håndteringen af fiskene (herunder aftørring og vejning) kan give anledning til stress og beskadigelser af fiskeyngelen, i særdeleshed hvor det drejer sig om de arter, der er små af størrelse. Derfor skal håndteringen af fiskeyngelen foretages med den yderste forsigtighed for at undgå at stresse og beskadige testfiskene.

Fiskene vejes igen på testens 28. dag (se afsnit 1.8.6). Hvis det imidlertid skønnes nødvendigt at genberegne foderrationen, kan fiskene vejes igen på testens 14. dag (se afsnit 1.8.2.3). Andre metoder, som f.eks. en fotografisk metode, vil kunne anvendes for at bestemme ændringer i fiskenes størrelse, og foderrationerne vil så kunne justeres ud fra dette.

1.8.2. Eksponeringsbetingelser

1.8.2.1. *Varighed*

Testens varighed er ≥ 28 dage.

1.8.2.2. *Belastningsgrad og bestandtæthed*

Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se tillæg 1). Hvis bestandtætheden er for stor, vil der opstå stress på grund af trængsel, hvilket vil føre til reduceret tilvækst og øget risiko for sygdomme. Hvis bestandtætheden er for lav, kan det medføre territorialadfærd, hvilket også vil kunne indvirke på væksten. Under alle omstændigheder skal belastningsgraden være så lav, at der kan opretholdes en koncentration af opløst ilt på mindst 60 % ASV uden beluftning. For regnbueørreders vedkommende har man ved en ring-test (3) påvist, at en belastningsgrad på 16 ørreder à 3-5 g i et volumen på 40 liter er acceptabel. Den anbefalede hyppighed for udskiftning af vandet under testen er 6 l pr. g fisk pr. dag.

1.8.2.3. *Fodring*

Fiskene skal fodres med et passende foder (tillæg 1) og tilstrækkeligt ofte til at frembringe en acceptabel tilvækst. Man må udvise omhu for at undgå mikrobiel vækst og urenheder i vandet. For regnbueørreders vedkommende vil en fodertilførsel på 4 % af kropsvægten pr. dag som regel opfylde disse betingelser (3)(16)(17)(18). Den daglige foderration kan deles i to lige store portioner, som gives fiskene ved to daglige fodringer med mindst fem timers mellemrum. Rationen baseres på fiskenes samlede startvægt i hver enkelt testbeholder. Hvis fiskene vejes igen på testens 14. dag, genberegnes rationen ud fra denne vægt. Fiskene bør ikke fodres i 24 timer inden vejningen.

Foderrester og fækalmateriale skal hver dag fjernes fra testbeholderne ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af opsugning.

1.8.2.4. *Lys og temperatur*

Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (tillæg 1).

1.8.3. Testkoncentrationer

Normalt kræves, uanset testens design, fem koncentrationer af testkemikaliet (se afsnit 1.7.2). Forudgående kendskab til testkemikaliets toksicitet (f.eks. fra akut-testning og/eller fra »range finding tests«) vil være nyttigt ved udvælgelsen af passende testkoncentrationer. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes færre end fem koncentrationer. Den højeste testkoncentration må ikke overstige kemikaliets opløselighedsgrænse i vand.

Når der anvendes en opløselighedfremmer som hjælpemiddel ved fremstillingen af stamopløsninger, må dens slutkoncentration ikke være højere end 0,1 ml/l og bør fortrinsvis være den samme i alle testbeholdere (se afsnit 1.6.3). Anvendelse af sådanne stoffer skal imidlertid så vidt muligt undgås.

1.8.4. Kontrolprøver

Antallet af fortyndingsvand-kontrolprøver afhænger af testens design (se afsnit 1.7-1.7.2). Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer, skal der desuden foretages det samme antal opløselighedsfremmer-kontrolprøver som fortyndingsvand-kontrolprøver.

1.8.5. Hyppighed af analyser og målinger

Under testen måles koncentrationerne af testkemikaliet med regelmæssige mellemrum (se nedenfor).

Ved gennemstrømningstest skal strømningshastighederne for fortyndingsmidlet og giftstof-stamopløsningen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og de må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Hvis testkemikaliets koncentrationer forventes at ligge inden for ± 20 % af de nominelle værdier (dvs. inden for området fra 80 til 120 % — se afsnit 1.6.2 og 1.6.3), anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres ved testens begyndelse og hver uge derefter. Ved test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier (baseret på oplysninger om testkemikaliets stabilitet), vil det være nødvendigt at analysere samtlige testkoncentrationer, men efter samme retningslinier.

Ved semistatiske (udskiftnings-) test, hvor testkemikaliets koncentration forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres, når de lige er fremstillet og umiddelbart inden udskiftning, ved undersøgelsens begyndelse og hver uge derefter. Ved test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, skal samtlige testkoncentrationer analyseres efter samme retningslinjer som for mere stabile kemikalier.

Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan påvises, at testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier eller den målte startkoncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på de nominelle eller de målte værdier.

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 µm). Det anbefales at centrifugere prøverne; men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan også filtrering accepteres.

Under testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i samtlige testbeholdere. Samlet hårdhedsgrad, alkalinitet og saltindhold (hvis dette er aktuelt) skal måles i kontrolbeholderne og i én beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis aktuelt) måles tre gange (ved testens begyndelse, midte og afslutning). Ved semistatiske test anbefales, at opløst ilt måles hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst én gang om ugen. pH skal måles ved begyndelsen og afslutningen af hver vandudskiftning ved statiske udskiftningstest og mindst én gang ugentligt ved gennemstrømningstest. Hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles én gang i hver test. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst én testbeholder.

1.8.6. Observationer

Vægt: Ved testens afslutning skal samtlige overlevende fisk vejes som vådvægt (duppes tørre), enten gruppevis pr. testbeholder eller enkeltvis. Vejning af fisk pr. testbeholder foretrækkes frem for individuel vejning, som kræver, at hver enkelt fisk skal mærkes. Hvis fiskene skal vejes enkeltvis med henblik på bestemmelse af enkeltfisk-specifik tilvækst, skal man vælge en mærkningsmåde, som undgår at stresse fiskene (der er egnede alternativer til frysemærkning, f.eks. anvendelse af tynd farvet fiskesnøre).

Fiskene skal i løbet af testperioden undersøges dagligt for eventuelle ydre abnormiteter (såsom blødninger eller misfarvning), og unormal adfærd registreres. Eventuelle mortaliteter skal registreres, og døde fisk skal fjernes hurtigst muligt. Døde fisk erstattes ikke, idet belastningsgraden og bestandtætheden er tilstrækkelige til, at indvirkninger på væksten som følge af ændringer i fiskeantallet pr. beholder undgås. Fodermængden skal imidlertid justeres.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Det anbefales, at en statistiker inddrages i både design og analyse af testen, eftersom denne testmetode tillader betydelige variationer i forsøgets design, som f.eks. antal testbeholdere, antal testkoncentrationer, antal fisk osv. I betragtning af valgmulighederne med hensyn til testens design vil der ikke blive givet nogen vejledning i statistiske procedurer her.

Tilvæksten bør ikke beregnes for testbeholdere, hvor mortaliteten overstiger 10 %. Mortalitetsprocenten skal imidlertid anføres for samtlige testkoncentrationers vedkommende.

Uanset hvilken metode, der anvendes til dataanalysen, er det centrale koncept den specifikke tilvækst r mellem tidspunktet t_1 og tidspunktet t_2. Denne kan defineres på flere måder afhængigt af, hvorvidt fiskene er mærket individuelt, eller hvorvidt der ønskes et beholdergennemsnit.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

hvor:

r_1 = enkeltfisk-specifik tilvækst

r_2 = beholdergennemsnits-specifik tilvækst

r_3 = »pseudo«-specifik tilvækst

w_1, w_2 = en bestemt fisks vægt på henholdsvis tidspunkt t_1 og t_2

$\log_e w_1$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens begyndelse

$\log_e w_2$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens afslutning

$\overline{\log_e w_1}$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne w_1 for fiskene i beholderen ved testperiodens begyndelse

$\overline{\log_e w_2}$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne w_2 for fiskene i beholderen ved testperiodens afslutning

t_1, t_2 = tidspunktet (dag) for testperiodens begyndelse og afslutning

r_1, r_2, r_3 kan udregnes for tidsrummet mellem 0 og 28 dage og, hvor det er aktuelt (dvs. når der er foretaget måling på dag 14), for tidsrummene mellem 0 og 14 samt mellem 14 og 28 dage.

2.1.1. Resultatanalyse ved regression (koncentrationsrespons-model)

Denne analysemetode fører frem til en passende matematisk sammenhæng mellem den specifikke tilvækst og koncentrationen og gør det således muligt at beregne »EC_x«, dvs. en hvilken som helst ønsket EC-værdi. Ved anvendelse af denne metode er udregningen af r for enkeltfisk (r_1) ikke nødvendig, og analysen kan i stedet baseres på r-beholdergennemsnitsværdien (r_2). Sidstnævnte metode foretrækkes. Den er også mest hensigtsmæssig, hvor den mindste fiskeart bruges.

Den beholdergennemsnits-specifikke tilvækst (r_2) bør plottes grafisk som funktion af koncentrationen, for at forholdet mellem koncentration og respons kan undersøges.

Når forholdet mellem r_2 og koncentration skal vises, bør man vælge en passende model, og valget skal begrundes på hensigtsmæssig vis.

Hvis der ikke er lige mange overlevende fisk i de enkelte beholdere, bør modeltilpasnings-metoden vægtes, hvad enten denne er simpel eller nonlineær, for at tage højde for grupper af uens størrelse.

Modeltilpasnings-metoden skal give mulighed for, at en beregning af f.eks. EC_{20} og dennes fordeling (enten standardfejl eller konfidensinterval) kan udledes. Grafen for den tilpassede model bør vises i forhold til dataene, så modeltilpasningens tilstrækkelighed tydeligt fremgår (9)(19)(20)(21).

2.1.2. **Analyse af resultaterne for beregningen af LOEC**

Hvis testen har omfattet replikation af samtlige beholdere ved samtlige koncentrationsniveauer, vil beregningen af LOEC kunne baseres på en variansanalyse (ANOVA) af den beholdergennemsnits-specifikke tilvækst (se afsnit 2.1), efterfulgt af en egnet metode (f.eks. Dunnett's eller Williams' test (13)(14)(15)(22)) til sammenligning af det gennemsnitlige r for hver enkelt koncentration med det gennemsnitlige r for kontrolgrupperne, for at identificere den laveste koncentration, ved hvilken denne forskel er signifikant på et sandsynlighedsniveau på 0,05. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt — ikke-normal fordeling (f.eks. Shapiro-Wilk's test) eller heterogen varians (Bartlett's test) — bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA.

Hvis testen ikke har omfattet replikation af beholdere ved hver enkelt koncentration, vil en ANOVA, der baseres på beholdere, være ikke-udslagsgivende eller umulig. I denne situation vil det være et acceptabelt kompromis at basere ANOVA på den »pseudo«-specifikke tilvækst r_3 for enkeltfisk.

Det gennemsnitlige r_3 for hver enkelt testkoncentration kan så sammenlignes med det gennemsnitlige r_3 for kontrolgrupperne. Derpå kan LOEC identificeres som tidligere beskrevet. Man må forstå, at denne metode hverken tager hensyn til eller yder beskyttelse mod variabilitet mellem beholdere, udover hvad der kan tilskrives variabiliteten mellem enkeltfisk. Erfaringerne har imidlertid vist (9), at variabilitet mellem beholdere har været meget lille sammenlignet med variabiliteten inden for de enkelte beholdere (dvs. mellem fisk). Hvis analysen ikke omfatter enkeltfisk, skal det med begrundelse anføres, hvilken metode der er benyttet til identifikation af ekstreme værdier.

2.2. TOLKNING AF RESULTATERNE

Resultaterne skal tolkes med forsigtighed, hvor den målte koncentration af giftstof i testopløsningerne ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, eller ved semistatiske test, hvor testkemikaliets koncentration i den nyligt fremstillede opløsning falder inden udskiftningen.

2.3. TESTRAPPORTEN

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.3.1. **Testkemikaliet:**

— fysisk beskaffenhed og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemiske identifikationsdata, herunder renhedsgrad og eventuelt analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet.

2.3.2. **Fiskeart(er), der indgår i testen:**

— videnskabeligt navn, og eventuelt

— stamme, størrelse, leverandør, evt. forudgående behandling osv.

2.3.3. **Testbetingelser:**

— anvendt testprocedure (f.eks. semistatisk-udskiftning, gennemstrømning, belastning, bestandtæthed, osv.)

— test-design (f.eks. antal testbeholdere, testkoncentrationer og replikater, antal fisk pr. beholder)

— metode til fremstilling af stamopløsninger samt udskiftningshyppighed (eventuelt anvendt opløselighedsfremmer og dennes koncentration skal anføres)

— de nominelle testkoncentrationer, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne, metoden, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning

— fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt), samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof, testmediets saltindhold (hvis målt) og samtlige andre udførte målinger

— vandkvaliteten i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype(r), -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

2.3.4. **Resultater:**

— dokumentation for, at kontrolgrupperne opfylder validitetskriteriet for overlevelse, samt data vedrørende mortaliteten ved de enkelte testkoncentrationer

— anvendte statistiske analyseteknikker, statistikker baseret på replikater eller fisk, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker

— data i tabelform vedrørende fiskenes individuelle og gennemsnitlige vægt på dag 0, 14 (hvis aktuelt) og 28, værdier for beholdergennemsnits- eller pseudo-specifik tilvækst (alt efter hvad der er aktuelt) i tidsrummet fra dag 0 til 28 eller eventuelt 0-14 og 14-28

— resultater af den statistiske analyse (dvs. regressionsanalyse eller ANOVA), fortrinsvis i tabelform og grafisk form, og LOEC ($p = 0,05$) og NOEC eller EC_x, eventuelt med standardfejl, alt efter hvad der er aktuelt

— forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliet.

3. REFERENCER

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855-1870.

(5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(7) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp. 287-297.

(8) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(15) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(16) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(17) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

TILLÆG 1

FISKEARTER ANBEFALET TIL TESTNING, OG EGNEDE TESTBETINGELSER

Arter	Anbefalet område for testtemperatur (°C)	Lysperiode (timer)	Anbefalet område for fiskenes startvægt (g)	Påkrævet målings-nøjagtighed	Belastningsgrad (g/l)	Bestandtæthed (pr. liter)	Foder	Testens varighed (dage)
Anbefalet art:								
Oncorhynchus mykiss Regnbueørred	12,5-16,0	12-16	1-5	Til nærmeste 100 mg	1,2-2,0	4	Mærkevare-tørfoder til laksefiskeyngel	≥ 28
Andre veldokumenterede arter:								
Danio rerio Zebrafisk	21-25	12-16	0,050-0,100	Til nærmeste 1 mg	0,2-1,0	5-10	Levende foder (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Riskarpe (Medaka)	21-25	12-16	0,050-0,100	Til nærmeste 1 mg	0,2-1,0	5-20	Levende foder (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

TILLÆG 2

NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Stof	Koncentrationer
Partikler	< 20 mg/l
Total organisk kulstof	< 2 mg/l
Ammoniak	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Total phosphorholdige organiske pesticider	< 50 ng/l
Total chlorholdige organiske pesticider plus polychlorerede biphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

TILLÆG 3

LOGARITMISKE RÆKKER AF KONCENTRATIONER, DER ER EGNEDE TIL TOKSICITETSTEST (9)

Søjle (antal koncentrationer mellem 100 og 10, eller mellem 10 og 1) [1]						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

[1] En række bestående af fem (eller flere) successive koncentrationer kan vælges fra en søjle. Midterpunkterne mellem koncentrationerne i søjle (x) findes i søjle (2x + 1). De anførte værdier kan repræsentere koncentrationer udtrykt i procent pr. volumen eller vægt (mg/l eller µg/l). Værdierne kan multipliceres eller divideres med en hvilken som helst potens af 10, alt efter hvad der er aktuelt. Søjle 1 kan eventuelt anvendes, hvis der har været betydelig tvivl om toksicitetsniveauet.

C.15. FISK, KORTTIDS TOKSICITETS-TEST UDFØRT PÅ FISKE-EMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL

1. METODE

Denne korttids toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 212 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Denne korttids toksicitets-test udført på fiske-embryoner og blommesækyngel er en korttids test, i hvilken det nybefrugtede æg er udsat for giftstof indtil slutningen af blommesæk-stadiet. Der skal ikke fodres i denne test, og testen skal således afsluttes, medens yngelen stadig får sin næring fra blommesækken.

Testens formål er at finde letale og til en vis grad subletale virkninger af kemikalier på specielle stadier og arter. Denne test kunne skaffe nyttig viden, idet den kunne a) danne en bro mellem letale og subletale test, b) blive anvendt som en screening-test enten for en test på alle tidlige livsstadier eller for en test for kronisk toksicitet og c) bruges til at teste arter, hvor dyrkningsteknikkerne ikke er tilstrækkeligt gode til at dække overgangsperioden mellem endogen og eksogen fodring.

Man bør erindre sig, at kun test, der omfatter alle stadier i fisks livscyklus, kan påregnes at give en præcis vurdering af kemikaliers kroniske toksicitet over for fisk, og at enhver begrænsning i påvirkning inden for livsstadierne kan reducere følsomheden og således undervurdere den kroniske toksicitet. Man må derfor forvente, at testen på fiske-embryoner og blommesækyngel har mindre følsomhed end en test, der omfatter alle tidlige livsstadier, specielt med hensyn til meget lipofile kemikalier (log P_{ow} > 4) og til kemikalier med en særlig type toksisk virkning. Imidlertid må man forvente mindre forskelle i følsomhed mellem de to test med hensyn til kemikalier, der har en ikke-specifik, narkotisk virkningsmåde (1).

Forud for offentliggørelsen af denne test udført på fiske-embryoner og blommesækyngel havde man størst erfaring med anvendelsen af ferskvandsfisken Danio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — almindeligt navn: zebrafisk). Mere detaljerede retningslinjer for resultater med denne art er derfor anført i tillæg 1. Dette udelukker ikke brugen af andre arter, for hvilke der ligeledes foreligger erfaringer (tabel 1A og 1B).

1.2. DEFINITIONER

Laveste koncentration med statistiskt sikkert observeret effekt (LOEC) er den laveste kemikalie-koncentration, der i testen har vist sig at resultere i en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$), sammenlignet med kontrollen. Alle testkoncentrationer over LOEC skal forårsage skadelige virkninger på samme eller højere niveau end observeret ved LOEC.

Koncentration uden statistiskt sikkert observeret effekt (NOEC) er test-koncentrationen lige under LOEC.

1.3. TEST-PRINCIPPET

Fiske-embryoner og blommesækyngel udsættes for en række koncentrationer af test-kemikaliet opløst i vand. Protokollen tillader valg mellem en semistatisk og en gennemstrømnings-procedure. Valget afhænger af test-kemikaliets natur. Testen begynder med, at man anbringer befrugtede æg i forsøgsbeholderne, og den slutter, lige før blommesækken er blevet fuldstændig resorberet af en hvilken som helst af fiskelarverne i en hvilken som helst forsøgsbeholder, eller før dødsfald indtræffer i kontrolbeholderne på grund af sult. Letale og subletale virkninger måles og sammenlignes med kontrolværdierne for at fastslå den laveste koncentration med statistisk observeret effekt og ud derfra den koncentration, der ikke giver nogen statistisk sikker virkning. Alternativt kan man analysere resultaterne ved hjælp af en regressionsmodel for at finde frem til den koncentration, der ville give en bestemt procentisk effekt (dvs. LC/EC_x, hvor x er en defineret procentisk virkning).

1.4. KENDSKAB TIL TEST-KEMIKALIET

Resultater fra en akut toksicitets-test (se metode C.1), fortrinsvis udført på arten valgt til denne test, bør foreligge. De kan være nyttige med henblik på valg af passende område af test-koncentrationer i testen udført på tidlige livsstadier. Vandopløselighed, (inklusive opløseligheden i test-vandet) og test-kemikaliets damptryk bør kendes. En pålidelig analyse til kvantificering af kemikaliet i test-opløsningerne med kendt og publiceret »accuracy« og nederste målegrænse bør foreligge.

Informationer om test-kemikaliet, nyttige for test-betingelserne, inkluderer strukturformel, renhedsgrad, lysstabilitet, stabilitet under testens betingelser, pKa, P_{ow} og resultater fra en test for spontan biologisk nedbrydelighed (se metode C.4).

1.5. TESTENS VALIDITET

En tests validitet forudsætter:

— den generelle overlevelse af befrugtede æg i kontrollerne, og, hvor relevant, i kar med rent opløsningsmiddel skal være større end eller lig med grænserne definerede i tillæg 2 og 3

— koncentrationen af opløst ilt skal være mellem 60 og 100 % af værdien for mætning med luft (ASV) i hele test-perioden

— vandtemperaturen må ikke variere mere end ± 1,5 °C imellem forsøgsbeholderne eller fra dag til dag på noget tidspunkt i testen, og den skal ligge i det temperaturområde, som gælder for den anvendte art. (tillæg 2 og 3).

1.6. BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.6.1. **Forsøgsbeholderne**

Enhver type glas eller andet inaktivt materiale kan anvendes. Forsøgsbeholdernes dimensioner skal være store nok til at klare kravene til belastningsraten (se sektion 1.7.1.2) Det anbefales at anbringe forsøgsbeholderne randomiseret. Et randomiseret design med grupper af forsøgsbeholdere, hvor samme behandling forefindes i hver gruppe, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret system, når der er systematiske virkninger i laboratoriet, som kan kontrolleres ved gruppering. I den påfølgende dataanalyse bør der tages hensyn til en eventuel gruppering. Forsøgsbeholderne bør skånes for unødvendige forstyrrelser.

1.6.2. **Valg af fiskeart**

Anbefalede fiskearter ses i tabel 1A. Dette udelukker ikke anvendelsen af andre arter (eksempler ses i tabel 1B), men test-proceduren må muligvis ændres for at opnå passende test-betingelser. Brug af andre arter og undersøgelsesmetode skal i så fald begrundes.

1.6.3. **Opbevaring af fisk til yngel**

Detaljer vedrørende pasning af fisk til yngel under tilfredsstillende omstændigheder kan findes i OECD TG 210 [1] og i referencerne (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4. **Håndtering af embryoner og fiskelarver**

Embryoner og fiskelarver kan, mens de udsættes for test-kemikaliet, opholde sig i mindre kar med netvægge eller i rør med net for enderne med disse mindre kar placerede i forsøgskarret, således at test-opløsningen kan flyde igennem. Man kan bevirke et ikke-turbulent flow gennem de mindre kar ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger karrene op og ned, dog altid med organismerne under overfladen; man kan også anvende et system med gennemskylning ved hjælp af overtryk. Befrugtede lakseæg kan anbringes på stativer eller net med masker tilstrækkeligt store til at lade larverne falde igennem efter udklækning. Pasteurpipetter er anvendelige til at flytte embryoner og larver i de semistatiske test i forbindelse med den daglige totale udskiftning af test-opløsningen (se paragraf 1.6.6).

I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i forøgskarret, skal disse fjernes, når æggene klækkes [1], idet man dog beholder det netværk, som hindrer fiskene i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke udsættes for luft, og net bør ikke bruges til at fjerne fisk fra beholdere (fra en sådan advarsel kan nok undtages mindre sarte arter, som fx karpen). Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og behøves ikke i alle tilfælde. Ved brug af den semistatiske teknik kan man anvende bægerglas eller lave beholdere, eventuelt, hvis nødvendigt, forsynet med et netværk løftet en smule op over bægerglassets bund. Hvis beholderne er store nok til at opfylde kravene til belastningsraten (se 1.7.1.2) kan overflytning af embryoner eller larver eventuelt undgås.

(1) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, «Fish, Early-life Stage Toxicity Test».

1.6.5. **Vand**

Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 4 og i hvilket fiskearten i kontrolbeholderne har en overlevelse mindst lige så god som beskrevet i tillæg 2 og 3. Kvaliteten må ikke ændre sig i løbet af test-perioden. pH skal holde sig inden for ± 0,5 pH-enheder. For at sikre, at vand til fortynding ikke får urimelig indflydelse på test-resultaterne (fx ved at danne kompleks med test-kemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (fx Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), væsentlige kationer og anioner (fx Ca, Mg, Na, K, Cl og So_4), pesticider (fx totale organofosfor- og totale organochlorinopesticider) totalt organisk kulstof og opslemmede faste stoffer bør fx foretages hver 3. måned, hvis man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (fx hver 6. måned).

1.6.6. **Test-opløsning**

Test-opløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved opblanding eller oprystning af test-kemikaliet i opløsningsvandet ad mekanisk vej (fx omrøring og ultralydbehandling). *Saturation colums (solubility columns)* kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Videst muligt bør brugen af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler undgås; imidlertid kan den type stoffer være nødvendige til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Som eksempler på anvendelige opløsningsmidler kan nævnes acetone, ethanol, methanol, dimethylformamide og triethyleneglycol. Som eksempel på en anvendelige dispergenser kan nævnes Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Stor omhu bør udvises, når man anvender stoffer, der er let biologisk nedbrydelige (fx acetone) og/eller let fordampelige, da de kan medføre problemer med bakterielle belægninger i gennemstrømnings-testene. Når et opløsningsmiddel anvendes, må det ikke have nogen signifikant virkning på overlevelsen eller synlig uheldig virkning på de tidlige livsstadier, som det kan kontrolleres i en test med kun opløsningsmiddel. Alle anstrengelser bør imidlertid gøres for at undgå brugen af sådanne stoffer.

I den semistatiske teknik kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen; enten i) fremstilles nye test-opløsninger i rene forsøgsbeholdere og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt inde i små volumina af den gamle opløsning til det nye forsøgsbeholdere, idet man undgår at udsætte dem for luft, eller ii) test-organismerne bibeholdes i forsøgsbeholderne, medens mindst tre fjerdedele af test-vandet udskiftes. Hvor hyppigt det skal gøres, afhænger af test-kemikaliets stabilitet, men en daglig udskiftning anbefales. Hvis tidligere stabilitetsforsøg (se sektion 1.4) har vist, at test-kemikaliets koncentration ikke er stabil (dvs. falder uden for 80-120 % af de nominelle grænser eller under 80 % af den målte begyndelseskoncentration) i løbet af udskiftningsperioden, bør man overveje at anvende en test med gennemstrømning. Under alle omstændigheder skal man være omhyggelig med ikke at stresse larverne, når vandet fornyes.

Til gennemstrømnings-testene bruges et system, som kontinuerligt afmåler og fortynder en stamopløsning med test-kemikaliet (fx peristaltpumper, *proportional diluter, saturator system*) for at yde en række forskellige koncentrationer til forsøgsbeholderne. Med mellemrum, fortrinsvis dagligt, kontrolleres flow-hastigheden fra stamopløsningen og vandfortyndingen, og de bør ikke variere mere end 10 % i test-forløbet. En flow-hastighed svarende til voluminet af mindst fem målekamre pr. døgn er fundet passende (2).

1.7. FREMGANGSMÅDE

Nyttig viden om, hvad testen med fiske-embryoner og blommesækyngel kan præstere, kan findes i litteraturen, og eksempler herpå kan findes i litteraturlisten (7)(8)(9).

1.7.1. **Omstændigheder ved belastningen**

1.7.1.1. *Varighed*

Helst skal testen begynde mindre end 30 minutter efter befrugtningen. Embryonerne sænkes ned i test-opløsningen, før eller så snart som muligt efter at blastocysten har delt sig, og i hvert fald før begyndelsen af gastrula-stadiet. Med æg, der leveres udefra, kan man ikke altid begynde testen umiddelbart efter befrugtningen. Da testens følsomhed kan blive alvorligt påvirket af en forsinket test-start, bør testen påbegyndes senest otte timer efter befrugtningen. Da fiskelarverne ikke fodres i test-perioden, afsluttes testen, lige før blom-

mesækken er resorberet fuldstændigt i en hvilken som helst larve i en hvilken som helst forsøgsbeholder, og før sultedøden indtræffer i kontrollerne. Varigheden afhænger af den anvendte art. Nogle anbefalede tider ses i tillæg 2 og 3.

1.7.1.2. *Belastning*

Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal kunne opfylde de statistiske krav. Æggene skal fordeles tilfældigt mellem de forskellige behandlinger og mindst 30 befrugtede æg, ligeligt fordelt, til mindst tre replikate testbeholdere pr. koncentration af test-kemikalium (så vidt gørligt, det kan være vanskeligt med nogle arter at opnå lige store mængder). Belastningsraten (biomasse per volumen af test-opløsningen) bør være så lav, så den opløste iltkoncentration på mindst 60 % ASV kan vedligeholdes uden beluftning. Til gennemstrømnings-test anbefales en belastningsrate på ikke over 0,5 g/l per døgn og ikke over 5 g/l opløsning på noget tidspunkt (2).

1.7.1.3. *Lys og temperatur*

Perioderne med lys og test-vandets temperatur skal passe til den valgte art (tillæg 2 og 3). For at holde temperaturen konstant kan det være nødvendigt med endnu et forsøgskar.

1.7.2. **Test-koncentrationer**

Normalt kræves fem koncentrationer af test-kemikaliet med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 3,2. Kurven fra de akutte toksicitets-test, som knytter LC_{50} til test-perioden, bør tages i betragtning, når man vælger området for test-koncentrationerne. Brug af færre end fem koncentrationer, for eksempel i en grænse-test, og et snævrere interval mellem koncentrationerne kan være rimeligt under nogle omstændigheder. Begrundelse skal anføres, hvis færre end fem koncentrationer anvendes. Det er ikke nødvendigt at teste koncentrationer højere end svarende til 96 timer LC_{50} eller 100 mg/l, afhængigt af hvilken af disse, der er lavest. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger deres opløselighed i test-vandet.

Når der anvendes et opløsningsmiddel som hjælp ved fremstillingen af test-opløsninger (se sektion 1.6.6), bør dets endelige koncentration i forsøgsbeholderen ikke overstige 0,1 ml/l og den skal være den samme i alle forsøgsbeholdere.

1.7.3. **Kontroller**

Sammen med test-serien skal udføres en kontrol af fortyndingsvandet (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt) og ligeledes, hvis relevant, en kontrol, som indeholder opløsningsmiddel (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt).

1.7.4. **Hyppighed af analyser og målinger**

I test-perioden måles koncentrationen af test-kemikaliet med regelmæssige mellemrum.

I semistatiske test, hvor koncentrationen af test-kemikaliet forventes at holdes inden for 20 % af det nominelle (dvs. inden for 80-120 %; se sektion 1.4 og 1.6.6), anbefales det, som et minimum, at den højeste og laveste test-koncentration måles, når den er frisk fremstillet og umiddelbart før udskiftning ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over test-perioden (dvs. analyserne skal udføres på en prøve fra den samme opløsning, når den er frisk fremstillet og ved dens anvendelse ved udskiftning).

I test, hvor koncentrationen af test-kemikaliet ikke forventes at holde sig inden for 20 % af den nominelle (baseret på kemikaliets stabilitets-data), er det nødvendigt at analysere alle test-koncentrationer, når de er frisk fremstillede og ved udskiftning, efter samme system (dvs. ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over test-perioden). Målingen af koncentrationen af test-kemikaliet før udskiftning er kun nødvendigt på en af beholderne i replikate bestemmelser for hver test-koncentration. Målingerne skal foretages mindst hver uge. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan vises, at test-kemikaliets koncentration testen igennem i tilstrækkelig grad har været holdt inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration, kan resultaterne baseres på nominelle eller målte begyndelsesværdier.

Hvad angår gennemstrømnings-test er det passende med et prøvetagningsregime som for de semistatiske test (men måling af udskiftede opløsninger er ikke mulig i disse tilfælde). Hvis imidlertid testen varer mere end en uge, er det tilrådeligt at øge antallet af prøvetagninger i den første uge (fx til tre) for at sikre, at test-koncentrationerne holder sig stabile.

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere (fx med et filter med 0,45 µm porestørrelse). Da imidlertid hverken centrifugering eller filtrering altid synes at skille den biotilgængelige fra den ikke-biotilgængelige del af test-kemikaliet, behøver prøver ikke at gennemgå disse behandlinger.

I løbet af testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i alle test-beholderne. Hårdhedsgrad og saltindhold (hvis relevant) bør måles i kontrollerne og i en beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis relevant) måles tre gange (i begyndelsen, midt i og ved afslutningen af testen). I de semistatiske test anbefales det at måle ilt hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst en gang om ugen. pH skal måles før og efter vandudskiftning i de semistatiske test og mindst en gang ugentlig i gennemstrømnings-testene. I hver test skal hårdhedsgraden måles en gang. Temperaturen skal måles daglig og helst være monitoreret kontinuerligt i mindst en test-beholder.

1.7.5. **Observationer**

1.7.5.1. *Fosterets udviklingstrin*

Fosterstadiet (dvs. gastrula-stadiet) bør fastslås så sikkert som muligt ved testens begyndelsen, hvor fosteret udsættes for test-kemikaliet. Dette kan gøres ved undersøgelse af en repræsentativ samling æg, som på passende vis præpareres og godkendes. I litteraturen kan man finde beskrivelser og illustrationer af fosterstadier (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2. *Udklækning og overlevelse*

Udklækning og overlevelse observeres mindst en gang om dagen og noteres. I begyndelsen af testen kan det være ønskeligt at foretage hyppigere observationer (fx hver halve time i løbet af de første tre timer), da overlevelsestid i nogle tilfælde kan være mere relevant end antallet af dødsfald alene (fx når der er akutte toksiske virkninger). Døde embryoner og larver skal fjernes med det samme, eftersom de kan henfalde hurtigt. Meget stor omhu skal udvises, når døde individer fjernes, så nærtliggende æg eller larver ikke bliver ramt eller fysisk beskadigede, da de er meget sarte og følsomme. Kriterier for død varierer efter stadium:

— **for æg**: særligt i de tidlige stadier se tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed

— **for embryoner**: manglende bevægelighed og/eller hjerteslag og/eller uklar misfarvning i arter, hvor embryonerne almindeligvis er gennemskinnelige

— **for larver**: manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller hvid uklar farvning af centralnervesystemet og/eller manglende reaktion på mekaniske stimuli.

1.7.5.3. *Abnormt udseende*

Antallet af larver, der udviser abnorm kropsform og/eller pigmentering, og tidspunkt for resorption af blommesækken skal noteres med passende mellemrum afhængigt af testens varighed og den beskrevne abnormitet. Det skal bemærkes, at abnorme embryoner og larver optræder almindeligt og kan opgøres til adskillige procent i kontrollerne hos visse arter. Abnorme dyr skal kun fjernes fra beholderne, når de er døde.

1.7.5.4. *Abnorm opførsel*

Abnorm opførsel, fx hyperventilation, ukoordineret svømning og atypisk ubevægelighed, skal noteres med passende intervaller afhængigt af testens varighed. Disse virkninger kan, når de opdages, selvom de er vanskelige at kvantitere, hjælpe med til at tolke mortalitets-data, dvs. skaffe viden om, hvorledes kemikaliets toksiske virkning udspiller sig.

1.7.5.5. *Længde*

Ved testens afslutning anbefales måling af individernes forskellige længde; standard, fork eller totallængden kan anvendes. Hvis imidlertid der forekommer finneråd (svamp) ved halefinnen eller erosion af finner, anvendes standardlængden. Almindeligvis vil i en vellykket test variationskoefficienten for længden i replikate bestemmelser almindeligvis ligge på ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Vægt*

Ved testens afslutning kan foretages vejning af dyrene; tørvægt (24 timer ved 60 °C) bør foretrækkes frem for vådvægt (aftørret). Almindeligvis vil i en vellykket test variationskoefficienten på vægten i replikate bestemmelser ligge på ≤ 20 %.

Disse observationer vil medføre, at nogle eller alle nedenstående data kan gøres til genstand for statistisk analyse:

— kumulativ mortalitet

— antal sunde larver ved afslutning af testen

— begyndelses- og sluttidspunkt for klækning (dvs. 90 % klækning i hvert replikat)

— det daglige antal larver, der klækkes

— længde (og vægt) af overlevende dyr ved testens afslutning

— antal larver, der er deforme eller har abnormt udseende

— antal larver, der opfører sig abnormt.

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Det anbefales, at en statistiker involveres både i design og i analyse af testen, eftersom metoden tillader betragtelige variationer i tilrettelæggelse af eksperimentet, som fx antallet af forsøgsbeholdere, antal test-koncentrationer, begyndelsesantal af befrugtede æg og de målte parametre. I betragtning af valgmulighederne i test-design, vil her ikke blive vejledt i statistiske procedurer.

Hvis LOEC/NOECs skal beregnes, er det, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse (ANOVA) eller at anvende kontingenstabeller. Dunnets metode kan være nyttig til at foretage multiple sammenligninger mellem resultater fra individuelle koncentrationer og kontrollerne (12)(13). Andre nyttige eksempler kan også findes (14)(15). Størrelsen af den målbare effekt ved anvendelse af ANOVA eller andre procedurer (dvs. styrken af testen) bør udregnes og angives. Det bør bemærkes, at ikke alle observationer listet i sektion 1.7.5.6 kan analyseres ved hjælp af ANOVA. Fx. bør kumuleret død og antallet af sunde larver analyseres ved hjælp af probit-metoder.

Hvis LC/ECxs skal beregnes, bør (en) passende kurve(r), fx den logistiske kurve, fittes til de ønskede data ved hjælp af en statistisk metode som fx mindste kvadraters metode eller ikke-lineære mindste kvadraters metode. Kurverne bør parametriseres, så den ønskede LC/ECx og dens standard error kan udregnes direkte. Dette vil gøre beregningen af sikkerhedsgrænserne for LC/ECx meget nemmere. Medmindre der er gode grunde til at foretrække andre sikkerhedsgrænser, bør to-sidede 95 % sikkerhedsgrænser angives. Fitningsmetoden skulle helst give mulighed for beregning af en signifikans for mangel på fit. Grafiske metoder for fitning af kurver kan anvendes. Regressionsanalyse kan anvendes på alle observationer listet i sektion 1.7.5.6.

2.2. TOLKNING AF RESULTATER

Hvor den målte koncentration af giftstoffet i test-opløsningen ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne tolkes med forsigtigthed. Tolkning af resultater, hvor koncentrationerne ligger over stoffets vandopløselighed, skal også gøres med forsigtighed.

2.3. TEST-RAPPORTEN

Test-rapporten bør indeholde følgende information:

2.3.1. **Test-kemikaliet:**

— dets fysiske natur og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemiske identitets-data, heri renhedsgrad og, hvor nødvendigt, den analytiske metode til kvantificering af stoffet.

2.3.2. **Arten, anvendt i testen:**

— dens videnskabelige navn, herkomst, antal forældre-fisk (dvs. hvor mange hundyr blev brugt for at fremskaffe det ønskede antal æg til testen), kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

2.3.3. **Forsøgsbetingelser:**

— anvendt fremgangsmåde (fx. semistatisk eller gennemstrømsforsøg, tidsforløb fra befrugtning til begyndelsen af testen, belastning, osv.)

— lysperiode(r)

— test-design (fx antal forsøgsbeholdere og replikater, antal embryoner pr. replikat

— fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, skal dets koncentration anføres)

— den nominelle test-koncentration, de målte værdier, gennemsnit og standarddeviationer for forsøgskarrene og metoden, hvorved de er opnået, og, hvis test-kemikaliet er opløseligt i vand i koncentrationer, der ligger under de undersøgte, skal der skaffes bevis for, at målingerne refererer til test-kemikaliet i opløsning

— karakteristik af fortyndningsvandet: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, niveau for residual-chlor (hvis målt), total organisk kulstof, opslemmede substanser, saltindhold i test-mediet (hvis målt) og enhver anden ting, som er målt

— vandkvalitet i forsøgskarrene: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt.

2.3.4. **Resultater:**

— resultater fra ethvert præliminært forsøg med test-kemikaliets stabilitet

— bevis på, at test-dyrene gennemsnitligt har overlevet i kontrollerne svarende til den accepterede standard

— data vedrørende mortalitet/overlevelse på embryon- og larvestadierne og den totale mortalitet/overlevelse

— antal dage til klækningen og antal klækninger

— data vedrørende længde (og vægt)

— morfologiske abnormiteter beskrives, hvis de forekommer

— abnorm opførsel beskrives, hvis den forekommer

— statistisk analyse og behandling af data

— vedrørende test, hvor ANOVA er anvendt, anføres laveste observerede effekt-koncentration (LOEC) ved $p = 0.05$ og den koncentration, der var uden effekt (NOEC) ved hver måling, inklusive de statistiske procedurer og en angivelse af, hvilken størrelse effekt der kunne påvises

— i forbindelse med test, hvor regressionsteknik er anvendt, anføres LC/EC_x og sikkerhedsgrænser og en graf med den fitningsmetode, der blev brugt til beregningen

— redegørelse for enhver afvigelse fra denne test-metode.

3. REFERENCER

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

TABEL 1A: Fiskearter, som er anbefalet til testning

Ferskvand
Oncorhynchus mykiss Regnbueørred (9) (16)
Danio rerio Zebrafisk (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Alm. karpe (8) (19)
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka (20) (21)
Pimephales promelas Fathead minnow (8) (22)

TABEL 1B: Eksempler på andre veldokumenterede arter, som også har været anvendt

Ferskvand	Saltvand
Carassius auratus Guldfisk (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Bluegill (8)	*Clupea harengus* Sild (24) (25)
	Gadus morhua Torsk (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23) (24) (25)

TILLÆG 1

VEJLEDNING I UDFØRELSE AF TOKSICITETS-TEST PÅ EMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL FRA ZEBRAFISK (BRACHYDANIO RERIO)

INTRODUKTION

Zebrafisken kommer oprindeligt fra Coromandelkysten på Indien, hvor den opholder sig i hurtigtrindende strømme. Den er en almindelig akvariefisk af karpefamilien, og oplysninger om fremgangsmåde i behandlingen og dyrkningen af den kan findes i standardreferenceværker om tropiske fisk. Dens biologi og anvendelse i fiskeriundersøgelser findes i et review af Laale (1).

Fisken bliver sjældent længere end 45 cm. Kroppen er cylindrisk med 7-9 mørkeblå horisontale striber. Disse striber løber ud i de caudale og anale finner. Ryggen er olivengrøn. Hannerne er slankere end hunnerne. Hunnerne er mere sølvskinnende, og abdomen er udspilet, særligt lige før æglægning.

Voksne fisk tåler store svingninger i temperatur, pH og vandhårdhed. For at sikre sig sunde fisk, som lægger æg af god kvalitet, bør man sørge for optimale betingelser.

Under æglægningen forfølger hannen hunnen og skubber til hende med snuden, og når æggene er kommet ud, bliver de befrugtede. Æggene, som er gennemsigtige og ikke-klæbende, synker til bunds, hvor de kan ædes af forældrene. Lys har indflydelse på æglægningen. Hvis lyset om morgenen er tilstrækkeligt, vil fiskene almindeligvis lægge æg i de tidlige timer efter morgengry.

En hun kan producere adskillige hundreder af æg ad gangen med ugers mellemrum.

FORÆLDREFISK, REPRODUKTION OG TIDLIGE LIVSSTADIER

Udvælg et passende antal sunde fisk og hold dem i passende vand (fx tillæg 4) i mindst to uger før den ønskede æglægning. Fiskene bør formere sig mindst en gang, før de producerer den samling æg, der skal bruges i testen. Fisketætheden bør ikke overstige 1 gram fisk pr liter. Regelmæssig fornyelse af vand eller anvendelse af rensningsanlæg kan tillade større fisketæthed. Temperaturen i tankene bør holdes på 25 ± 2 °C. Fiskene bør fodres med en varieret kost fx af passende kommercielt tørfoder, levende nyklækkede Arthemia, chironomider, dafnier, hvide orm (Enchytraeider).

Nedenfor er skitseret to fremgangsmåder, der i praksis har ydet en tilstrækkelig mængde sunde, befrugtede æg til brug i en test:

i) Otte hunner og 16 hanner placeres i et akvarium med 50 liter fortyndingsvand, skærmet mod direkte lys og holdt så uforstyrret som muligt i mindst 48 timer. En bakke til ægopsamling anbringes i bunden af akvariet om eftermiddagen, dagen før testen begynder. Ægopsamlingsbakken består af en ramme (plexiglas eller andet passende materiale), 5-7 cm høj med et groft 2-5 mm net fæstnet til kanten og et 10-30 µm fint net på bunden. Et passende antal »æglægnings-træer«, lavet af optrevlet nylonreb, sættes fast på det grove net. Fiskene efterlades i mørke i 12 timer, hvorefter et svagt lys tændes, hvilket vil føre til æglægning. To til fire timer efter æglægningen fjernes bakken, og æggene samles. Bakken vil hindre fiskene i at æde æggene og letter samtidig indsamlingen af æggene. Disse fisk skal have lagt æg mindst en gang før den, hvorfra æggene anvendes til testning.

ii) Fra fem til ti han- og hunfisk holdes adskilt hver for sig i mindst to uger før den planlagte æglægning. Efter 5-10 dage vil hunnernes abdomen være udspilet og deres papillae genitales synlige. Sådanne har hanfisk ikke. Æglægning foregår i et æglægningsakvarium, forsynet med en falsk netværksbund (som ovenfor). Akvariet fyldes med fortyndingsvand, så der står 5-10 cm vand over nettet. En hun og to hanner anbringes i akvariet dagen før den planlagte æglægning. Vandtemperaturen øges gradvist til en grad over akklimatisationstemperaturen. Lyset slukkes, og akvariet holdes så uforstyrret som muligt. Næste morgen tændes et svagt lys, som får æglægningen til at gå i gang. 2-4 timer efter fjernes fiskene, og æggene indsamles. Hvis man har brug for flere æg, end en enkelt hun kan levere, opstilles flere akvarier parallelt. Ved at notere sig formeringens størrelse og kvalitet for hver hun før testen, kan man udvælge sig de bedste hunner til formering.

Æggene flyttes til forsøgsakvariet ved hjælp af glasrør med en indre diameter ikke mindre end 4 mm og forsynede med en suge-ballon. Mængden af vand, der flyttes med æggene ved flytningen, skal være så ringe som muligt. Æggene er tungere end vand og synker selv ud af røret. Omhu skal udvises, så æg (og larver) ikke kommer i kontakt med luften. Ved hjælp af mikroskopiske undersøgelser af prøver fra æggene sikrer man sig, at de første stadier ikke udviser irregulære former. Det er ikke tilladt at desinficere æggene.

Mortaliteten blandt æggene er størst inden for de første 24 timer efter befrugtningen. Ofte ses en mortalitet på 5-40 %. Æg degenerer på grund af befrugtning, der ikke lykkes, eller udviklingsfejl. Æggenes kvalitet synes at bero på hunfisken, da nogle hunner hele tiden producerer gode ægkvaliteter, mens andre aldrig gør det. Udviklingshastigheden og klækningshastigheden varierer fra et kuld til et andet. Hvor befrugtningen lykkes, og hvor blommesækynglen klarer sig godt, overlever normalt over 90 %. Ved 25 °C klækkes æggene 3-5 dage efter befrugtningen, og blommesækken resorberes ca. 13 dage efter befrugtningen.

Fosterudviklingen er vel beskrevet af Hisaoka og Battle (2). På grund af æggenes og de udklækkede larvers gennemsigtighed kan fiskenes udvikling følges, og tilstedeværelsen af malformationer observeres. Omkring 4 timer efter æglægningen kan de ikke-befrugtede æg skelnes fra de befrugtede (3). Til denne undersøgelse bliver æg og larver anbragt i små undersøgelseskar og set på under mikroskop.

Testbetingelserne, som vedrører de tidlige livsstadier, findes i tillæg 2. De optimale værdier for pH og vandhårdhed er 7,8 og 250 mg $CaCO_3$/l, respektive.

BEREGNINGER OG STATISTIK

Der foreslås beregninger i to tempi. Først foretages statistisk analyse af data vedrørende mortalitet, unormal udvikling og klækningstidspunkt. Derefter evalueres kropslængden statistisk for de koncentrationer, hvor ingen af ovennævnte negative virkninger kunne ses. Denne fremgangsmåde tilrådes, eftersom giftstoffet kan tænkes selektivt at dræbe mindre fisk, forsinke klækningstidspunktet og forårsage grove malformationer og på den måde føre til længdemålinger med bias. Ydermere vil der være stort set samme antal fisk at måle pr. undersøgelse, hvilket sikrer test-statistikkens validitet.

LC_{50} OG EC_{50}-BESTEMMELSER

Procentdelen af overlevende æg og larver beregnes og korrigeres for mortalitet i kontrollerne efter Abbotts formel (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

hvor

P = korrigeret % overlevelse

P' = % observeret overlevelse i test-koncentrationen

C = % overlevelse i kontrollen

Hvis man ønsker at inkludere morfologiske abnormiteter i EC_{50}-statistikken, kan man finde vejledning i Stephan (5).

ESTIMERING AF LOEC OG NOEC

Et af formålene med æg og blommesækyngelstestene er at sammenligne koncentrationerne over nul med kontrolgruppens, dvs. at bestemme LOEC. Derfor bør multiple sammenligningsprocedurer anvendes (6)(7)(8)(9)(10).

REFERENCER

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Developmental Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

TILLÆG 2

TEST-BETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR DE ANBEFALEDE ARTER

Art	Temperatur (°C)	Saltindhold (0/00)	Lysperiode (timer)	Varighed af stadier (dage)		Typisk testvardighed	Overlevelsekontrol (Minimum %)	
				Embryoner	Blommesækyngel		Klæknings succes	Efter klækning
FERSKVAND								
Brachydanio rerio Zebrafisk	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (8-10 dage)	80	90
Oncorhynchus mykiss Regnbuecørred	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30-35	25-30	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 20 dage efter klækning (50-55 dage)	66	70
Cyprinus carpio Alm. karpe	21-25	—	12-16	5	> 4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage)	80	75
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (13-16 dage)	80	80
Pimephales promelas Fathead minnow	25 ± 2	—	16	4-5	5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage)	60	70

(1) Gældende for embryoner.
(2) Gældende for larver.
(3) Mørke for embryoner og larver op til en uge efter klækning, undtagen ved inspektion. Siden svagt lys i resten af testen.

TILLÆG 3

VELDOKUMENTEREDE TEST-BETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR ANDRE BRUGBARE ARTER

Art	Temperatur (°C)	Saltindhold (0/00)	Lysperiode (timer)	Varighed af stadier (dage)		Typisk testvarighed for embryoner og blommesækyngel	Overlevelsekontrol (Minimum %)	
				Embryoner	Blommesækyngel		Klæknings succes	Efter klækning
FERSKVAND								
Carassius auratus Guldfisk	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage)	—	80
Leopomis macrochirus Bluegill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage)	—	75
SALTVAND								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22-25	15-22	12	1,5	10	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (6-7 dage)	80	60
Clupea harengus Sild	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (23-27 dage)	60	80
Gadus morhua Torsk	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (18 dage)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15-30	12	—	—	Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4-7 dage efter klækning (28 dage)	> 75	80

TILLÆG 4

NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND

Substans	Koncentration
Faste stoffer	< 20 mg/l
Totalt organisk kulstof	< 2 mg/l
Ikke-ioniseret ammonium	< 1 µg/l
Residualt chlor	< 10 µg/l
Total organophosphor-pesticider	< 50 ng/l
Total organochlorino-pesticider + polychlor-biphenyler	< 50 ng/l
Total organisk chlor	< 25 ng/l

C.16. HONNINGBIER — AKUT ORAL TOKSICITETS-TEST

1. METODE

Denne korttids toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 213 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Denne toksicitets-test er en laboratoriemetode beregnet til at fastlægge den orale akutte toksicitet af plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier på voksne arbejdsbier.

I forbindelse med fastlæggelse og evaluering af stoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at fastslå den akutte orale toksicitet over for honningbier, fx når det er sandsynligt, at bier bliver udsat for stoffet. Den akutte orale toksicitets-test udføres for at fastslå den iboende toksicitet af pesticider og andre kemikalier over for bier. Resultaterne af testen bør anvendes for at fastslå en eventuel nødvendighed af yderligere undersøgelser. Særligt kan metoden anvendes i programmer med henblik på at vurdere de risici, pesticider udgør for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitets-test til tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg(1). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og test-procedurens præcision.

1.2. DEFINITIONER

Akut oral toksicitet: er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en oral indtagelse af en enkelt dosis af test-kemikaliet.

Dosis: er den mængde af test-kemikaliet, som er indtaget. Dosis udtrykkes som masse (mg) af test-kemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde test-kemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

LD_{50} (Mediane letale dosis) oral: er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50 % af dyrene, indtaget oralt. LD_{50}-værdien udtrykkes i mg test-kemikalium per bi. Hvad pesticider angår, kan test-kemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

Mortalitet: et dyr regnes for dødt, når det er totalt immobilt.

1.3. TEST-METODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (Apis mellifera) udsættes for en række doser af test-kemikaliet i en rørsukkeropløsning. Derefter får bierne samme føde, men uden test-kemikaliet. Mortaliteten noteres daglig i mindst 48 timer og sammenlignes med kontrolværdierne. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. ≤ 10 %, bør man forlænge test-perioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne LD_{50} ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

1.4. TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

— at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning

— LD_{50} for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5. BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.5.1. **Indsamling af bier**

Unge, voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles om morgenen eller om aftenen før brugen og holdes under

test-betingelserne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med »bi-brød« (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter osv., bør ikke bruges til toksicitets-undersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2. Opbevaring og fodringsbetingelser

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangstræbure, osv. Det er bedst med ti bier pr bur. Størrelsen af test-burene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være for tilstrækkelig plads.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70 %, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % v/v). Efter at test-dosis er givet, forsynes bierne med føde ad libitum. Fordringssystemet bør tillade registrering af fødeindtagelse for hvert bur (se sektion 1.6.3.1). Et glasrør, ca. 50 mm langt med 10 mm lysning, med den åbne ende indsnævret til 2 mm, kan anvendes.

1.5.3. Forberedelse af bierne

De indsamlede bier fordeles tilfældigt i burene, som placeres tilfældigt i forsøgsrummet.

Bierne må sulte op til to timer før forsøgets begyndelse. Det anbefales, at bierne sulter før behandlingen, så at alle bier står lige med hensyn til tarmindhold ved forsøgets begyndelse. Moribunde bier skal kasseres og erstattes med sunde bier, før forsøget indledes.

1.5.4. Fremstilling af doser

Hvor test-kemikaliet er kan blandes i vand, kan det dispenseres direkte i en 50 % rørsukkeropløsning. Der kan i forbindelse med tekniske produkter og stoffer med lav vandopløselighed anvendes hjælpestoffer såsom organiske opløsningsmidler, blødgøringsmidler eller dispergenser med lav toksicitet over for bier (fx acetone, dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Hjælpestoffets koncentration afhænger af test-stoffets opløselighed og bør være den samme i alle koncentrationer, der undersøges. Imidlertid er en koncentration af hjælpestoffet på 1 % normalt passende og bør ikke overskrides.

Tilsvarende kontroloplosninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre test-kemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper: en til opløsning i vand og en til rørsukkeropløsning med opløsningsmiddel/hjælpestof med samme koncentration som i forsøgsopløsningerne.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. Test- og kontrolgrupper

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af LD_{50} med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for LD_{50}. Fortyndingsfaktor og antal dosis-koncentrationer bør imidlertid beregnes ud fra toksiciteteskurvens hældning (dosis over for mortalitet), idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosis-området kan være til hjælp for fastlæggelse af dosis-koncentrationerne.

Mindst tre test-grupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver test-koncentration. Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med test-serien. Kontrolgrupper skal også inkluderes til belysning af de opløsningsmidler og hjælpestoffer, der anvendes (se sektion 1.5.4).

1.6.2. Toksisk standard

En toksisk standard (dvs. et kendt toksisk stof) skal inkluderes i test-serien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede LD_{50}-værdi. Mindst tre bure, hver med ti bier, skal udsættes for hver test-dosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoate, for hvilket det angives, at den orale LD_{50}-24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0,10-0,35 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosis-respons (fx parathion).

1.6.3. **Belastning**

1.6.3.1. *Administration af doser*

Hver test-gruppe bier skal forsynes med 100-200 ml 50 % vandig rørsukkeropløsning, indeholdende test-kemikaliet i den rigtige koncentration. Større volumen kræves til kemikalier, der er tungt opløselige, har lav toksicitet eller lav koncentration i præparatet, da der skal bruges større mængder i rørsukkeropløsningen. Mængden af behandlet føde, der indtages, skal monitoreres. Når den er indtaget (almindeligvis efter 3-4 timer), skal fordringssystemet fjernes fra buret og udskiftes med et nyt, som kun indeholder rørsukkeropløsning, og som tilføres ad libitum. Nogle stoffer kan i højere doser medføre, at der indtages kun lidt eller ingen føde. Efter højst 6 timer skal resten af den behandlede føde fjernes og erstattes med ren rørsukkeropløsning. Mængden af behandlet føde, der er indtaget, skal beregnes (fx via måling af volumen/vægt af resterende behandlet føde).

1.6.3.2. *Varighed*

Testen varer fortrinsvis til 48 timer efter at test-opløsningen er blevet erstattet med ren rørsukkeropløsning. Hvis mortaliteten fortsætter med at stige med mere end 10 % efter de første 24 timer, bør test-varigheden udvides til maksimalt 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontroldyrene ikke overstiger 10 %.

1.6.4. **Observationer**

Mortaliteten registreres 4 timer efter testens start og derefter 24 og 48 timer efter (dvs. efter givet dosis). Hvis en længere observationsperiode er nødvendig, registreres yderligere hver 24. time op til 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontroldyrene ikke overstiger 10 %.

Den mængde føde, der indtages af hver gruppe skal vurderes. Sammenligning af den hastighed, hvormed den behandlede og den ikke behandlede føde indtages inden for 6 timer, kan skaffe viden om den behandlede fødes smagskvalitet.

Enhver unormal opførsel observeret blandt bierne i forsøgsperioden skal registreres.

1.6.5. **Grænse-test**

I visse tilfælde (fx hvis et test-kemikalium forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænse-test, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at LD_{50} er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate test-grupper til test-dosis, de relevante kontroller, vurderingen af indtaget behandlet føde og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se sektion 1.6.4), skal de registreres.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (fx probit-analyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3)(4). Plot dosis-respons-kurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, LD_{50} med 95 % sikkerhedsgrænser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.hj. af Abbotts korrektion (4) (5). Hvis den behandlede føde ikke er totalt indtaget, skal dosis af test-kemikalium indtaget pr. gruppe bestemmes. LD_{50} skal udtrykkes som mg test-kemikalium pr. bi.

2.2. TEST-RAPPORT

Test-rapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1. **Test-kemikalium:**

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (fx stabilitet i vand, damptryk)

— data for kemisk identifikation, inklusive struktur-formel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2. **Test-dyr**

— videnskabeligt navn, race, omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling

— informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af test-bier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

2.2.3. **Test-omstændigheder**

— temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad

— opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale

— fremgangsmåde ved fremstilling af stamopløsning og test-opløsning (eventuelt opløsningsmiddel og dets koncentration skal angives)

— test-design, dvs. antal teste-koncentrationer og deres størrelse, antal kontroller; for hver test-koncentration og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. bur

— dato for testen.

2.2.4. **Resultater:**

— resultater af eventuelle forsøg med koncentrations-områder

— rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt

— graf af dosis-responskurve ved forsøgets slutning

— LD_{50}-værdier med 95 % sikkerhedsgrænser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for test-kemikalium og toksisk standard

— statistisk procedure for fastlæggelse af LD_{50}

— mortaliteten blandt kontroldyrene

— andre biologiske effekter oberverede eller målte, fx abnorm opførsel blandt bierne (inklusive manglende indtagelse af test-dosis), konsumptionshastighed både hvad angår den behandlede og den ubehandlede gruppe

— enhver fravigelse af test-fremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

3. **REFERENCER**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

C.17. HONNINGBIER — AKUT KONTAKT TOKSICITETS-TEST

1. METHODE

Denne akut toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 214 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Denne toksicitets-testmetode er en laboratoriemetode, beregnet til at vurdere den akutte toksicitet over for voksne arbejdshonningbier ved kontakt med plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier.

Ved vurderingen og evalueringen af kemikaliers toksiske karakteristika kan det være ønskværdigt at bestemme den akutte kontakttoksicitet over for honningbier, fx når det er sandsynligt, at bier kan blive udsat for de pågældende kemikalier. Den akutte toksicitets-test udføres for at bestemme pesticiders og andre kemikaliers naturlige toksicitet over for bier. Resultaterne af denne test er tænkt anvendt til at fastslå behovet for yderligere evaluering. Specielt kan metoden bruges i programmer, der evaluerer den fare, som pesticider betyder for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitets-test til tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg (1). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og test-procedurens præcision.

1.2. DEFINITIONER

Akut kontakt toksicitet: er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en lokal applikation af en enkelt dosis af et kemikalium.

Dosis: er den mængde af test-kemikaliet, som er påført. Dosis udtrykkes som masse (mg) af test-kemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde test-kemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

LD_{50} (Mediane letale dosis) kontakt: er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50 % af dyrene, når det administreres via kontakt. LD_{50}-værdien udtrykkes i mg test-kemikalium per bi. Hvad pesticider angår, kan test-kemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

Mortalitet: et dyr regnes for dødt, når det er totalt immobilt.

1.3. TEST-METODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (Apis mellifera) udsættes for en serie forskellige doser af test-kemikaliet, opløst i et passende medie, gennem en direkte applikation på thorax (små dråber). Forsøget varer 48 timer. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. ≤ 10 %, bør man forlænge test-perioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne LD_{50} ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

1.4. TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

— at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning

— LD_{50} for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5. BESKRIVELSE AF TEST-METODEN

1.5.1. Indsamling af bier

Unge, voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand, race osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles aftenen før brugen og holdes under test-betingel-

serne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med »bi-brød« (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter osv., bør ikke bruges til toksicitets-undersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2. Opbevaring og fodringsbetingelser

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangstræbure, osv. Størrelsen af test-burene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være tilstrækkelig plads. Det er bedst med ti bier pr. bur.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70 %, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % v/v) og tilbydes ad libitum under forsøget, idet man anvender et fodringssystem, der kan være et glasrør (ca. 50 mm langt og med en lysning på 10 mm og med den åbne ende indsnævret til 2 mm i diameter).

1.5.3. Forberedelse af bierne

De indsamlede bier kan bedøves med carbon dioxide eller nitrogen, når test-kemikaliet skal appliceres. Mængden af anæstetikum og bedøvelsestiden bør være mindst mulig. Moribunde bier skal kasseres og erstattes af sunde bier, før testen påbegyndes.

1.5.4. Fremstilling af doser

Test-kemikaliet skal appliceres som en opløsning i et medium, dvs. et organisk opløsningsmiddel eller en vandig opløsning med overfladeaktive stoffer. Som organisk opløsningsmiddel foretrækkes acetone, men andre organiske opløsningsmidler med lav toksicitet over for bier kan bruges (fx dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Vandopløselige færdiggjorte produkter og højpolære organiske substanser, som ikke er opløselige i organiske opløsningsmidler, kan være lettere at påføre, hvis de tilberedes i en svag opløsning af kommercielle overfladeaktive stoffer (fx. Agral, Cittowet, Lubrol, Triton, Tween).

Tilsvarende kontroloplø sninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre test-kemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper, en behandlet med vand og en med opløsningsmiddel/dispergent.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. Test- og kontrolgrupper

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af LD_{50} med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for LD_{50}. Antallet af doser bør imidlertid beregnes ud fra toksiciteteskurvens hældning (dosis over for mortalitet), idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosis-området kan være til hjælp for fastlæggelse af dosis-koncentrationerne.

Mindst tre test-grupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver test-koncentration.

Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med test-serien. Hvis der er anvendt et organisk opløsningsmiddel eller et overfladeaktivt stof, skal der inkluderes yderligere tre kontrolgrupper på ti bier hver for opløsningsmidlet eller det overfladeaktive stof.

1.6.2. Toksisk standard

En toksisk standard skal inkluderes i test-serien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede LD_{50}-værdi. Mindst tre bure, hver med ti bier, skal udsættes for hver test-dosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoate, for hvilket det angives, at kontakt-LD_{50}-24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0.10-0.30 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosis-respons (fx parathion).

1.6.3. **Belastning**

1.6.3.1. *Administration af doser*

Bedøvede bier behandles individuelt med lokal applikation. Bierne randomiseres til de forskellige test-doser og kontroller. 1 ml af opløsningen, der indeholder test-kemikaliet i den passende koncentration, anbringes med en mikroapplikator på dorsalsiden af thorax af bien. Andre volumina kan anvendes, hvis der er grund til det. Efter applikationen anbringes bierne i test-burene og forsynes med rørsukkeropløsning.

1.6.3.2. *Varighed*

Forsøgets varighed er almindeligvis 48 timer. Hvis mortaliteten øger mere end 10 % mellem 24 og 48 timer, skal forsøgsvarigheden forøges til op til 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontrollerne ikke overstiger 10 %.

1.6.4. **Observationer**

Mortaliteten registreres 4, 24 og 48 timer efter applikationen. Hvis det er nødvendigt med en forlænget observationsperiode, skal observationerne foretages med 24-timers intervaller, op til 96 timer, under forudsætning af, at kontrolmortaliteten ikke overstiger 10 %.

Enhver unormal opførsel som observeres i testperioden skal registreres.

1.6.5. **Grænse-test**

I visse tilfælde (fx hvis et test-kemikalium forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænse-test, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at LD_{50} er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate test-grupper til test-dosis, de relevante kontroller og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se sektion 1.6.4), skal de rapporteres.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (fx probit-analyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3)(4). Plot dosis-respons-kurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, (dvs. efter 24, 48 og, hvis relevant, 72 og 96 timer) og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, LD_{50}, med 95 % sikkerhedsgrænser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.hj. af Abbotts korrektion (4)(5). LD_{50}, skal udtrykkes som mg test-kemikalium pr. bi.

2.2. TEST-RAPPORT

Test-rapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1. **Test-kemikalium:**

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (fx stabilitet i vand, damptryk)

— data for kemisk identifikation, inklusive struktur-formel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2. **Test-dyr**

— videnskabeligt navn, race, omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling

— informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af test-bier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

2.2.3. **Test-omstændigheder**

— temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad

— opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale

— fremgangsmåde ved administration af test-kemikalium (det anvendte opløsningsmedium, volumen af test-opløsning, det anvendte anæstetikum

— test-design, fx antal og størrelse af test-doser, antal kontroller; for hver test-dosis og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. bur

— dato for testen.

2.2.4. **Resultater:**

— resultater af eventuelle forsøg med koncentrations-områder

— rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt

— graf af dosis-responskurve ved forsøgets slutning

— LD_{50}-værdier med 95 % sikkerhedsgrænser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for test-kemikalium og toksisk standard

— statistisk procedure for fastlæggelse af LD_{50}

— mortaliteten blandt kontroldyrene

— andre biologiske effekter, observerede eller målte, og abnorm opførsel blandt bierne

— enhver fravigelse af test-fremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

3. **REFERENCER**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

C.18. ADSORPTION/DESORPTION MED EN BATCH-LIGEVÆGTSMETODE

1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG 106: »Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method« (2000).

1.1. INDLEDNING

I metoden er taget hensyn til en ringtest og en workshop om udvælgelse af jord med henblik på udvikling af en adsorptionstest (1) (2) (3) (4) samt eksisterende guidelines på nationalt plan (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptions-/desorptionsundersøgelser kan skaffe vigtige oplysninger om kemiske stoffers mobilitet og fordeling i biosfærens jord-, vand- og luftcompartments (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Sådanne oplysninger kan anvendes til opstilling af prognoser eller overslagsberegninger f.eks. vedrørende muligheden for kemisk nedbrydning (22) (23), omdannelse og optagelse i organismer (24), udvaskning gennem jordbundsprofilen (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), fordampning fra jorden (21) (29) (30) og afstrømning fra jordoverfladen til naturlige vande (18) (31) (32). Adsorptionsdata kan anvendes til at drage sammenligninger og opstille modeller (19) (33) (34) (35).

Et kemisk stofs fordeling mellem jord- og vandfase er en kompleks proces, som bestemmes af en række forskellige faktorer: stoffets kemiske egenskaber (12) (36) (37) (38) (39) (40), jordens karakteristika (4) (12) (13), (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) samt klimatiske faktorer som nedbør, temperatur, sollys og vind. De mange fænomener og mekanismer, som medvirker ved adsorption af et kemisk stof til jord, kan således ikke fastlægges fuldt ud ved en forenklet laboratoriemodel som nærværende metode. Men uanset at denne tentativt opstillede metode ikke kan dække alle tilfælde, der kan forekomme i miljøet, giver den tilstrækkelige oplysninger om den miljømæssige relevans af adsorptionen af et kemisk stof.

Se også den generelle indledning.

1.2. OMRÅDE

Metodens formål er at gøre det muligt at foretage en skønsmæssig beregning af et stofs adsorption/desorption i jord. Målet er at nå frem til en sorptionsværdi, med hvilken fordelingen under forskellige miljøforhold kan forudsiges; til dette formål bestemmes ligevægtsadsorptionskoefficienter for et kemisk stof på forskellige jordtyper som funktion af jordens egenskaber (f.eks. dens indhold af organisk kulstof, lerindholdet samt jordens struktur og pH). Det er nødvendigt at anvende forskellige jordtyper for at få så bred dækning som muligt af vekselvirkningen mellem et givet stof og naturligt forekommende jordtyper.

I denne metode forstås ved adsorption den proces, hvorved et kemisk stof bindes til overfladen af forskellige jordtyper; der skelnes her ikke mellem forskellige adsorptionsprocesser (fysisk og kemisk adsorption) og processer som overfladekatalyseret nedbrydning, masseadsorption og kemiske reaktioner. Den adsorption, som finder sted på kolloide partikler (diameter < 0,2 μm) dannet af jordarterne, tages ikke i betragtning.

De jordparametre, som anses for at have størst betydning for adsorptionen, er: organisk kulstofindhold (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), lerindhold og jordstruktur (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) samt for ioniserbare forbindelser pH-værdien (3)(4)(42). Andre jordparametre, der kan have indflydelse på adsorptionen/desorptionen af et stof, er effektiv kationudvekslingskapacitet (ECEC), indhold af amorfe jern- og aluminiumoxider, specielt for vulkanske og tropiske jordarter (4), samt virksom overflade (49).

Testen er udviklet med henblik på vurdering af et kemisk stofs adsorption på forskellige jordtyper med varierende organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur samt pH. Testen omfatter tre trin:

Trin 1: Indledende undersøgelse til bestemmelse af:

- forholdet jord/opløsning
- ligevægtstid for adsorptionsprocessen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt
- prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt prøvestoffets stabilitet inden for prøveperioden.

Trin 2: Screeningtest: adsorptionen i fem forskellige jordtyper undersøges adsorptionskinetisk ved én enkelt koncentration og bestemmelse af fordelingskoefficienterne K_d og K_{oc}.

Trin 3: Bestemmelse af Freundlich-adsorptionsisotermer til fastlæggelse af koncentrationens indflydelse på adsorptionen på jord.

Undersøgelse af desorption ved hjælp af desorptionskinetik/Freundlich desorptionsisotermer (tillæg 1).

1.3. DEFINITIONER OG ENHEDER

Symbol	Definition	Enhed
A_{t_i}	adsorptionsprocent til tiden t_i	%
A_{eq}	adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masse prøvestof adsorberet til jorden til tiden t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masse prøvestof adsorberet på jorden i løbet af tidsintervallet Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	masse prøvestof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt	µg
m_0	masse prøvestof i prøveglasset ved adsorptionstestens begyndelse	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	masse prøvestof målt i en prøve (v_a^A) til tidspunktet t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masse af stoffet i opløsningen ved adsorptionsligevægt	µg
m_{soil}	mængde jordfase, angivet som tør masse jord	g
C_{st}	massekoncentration af stamopløsningen af stoffet	µg cm^{-3}
C_0	initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	massekoncentration af stoffet i den vandige fase til tidspunktet t_i for analysens udførelse	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	indhold af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	massekoncentration af stoffet i vandig fase ved adsorptionsligevægt	µg cm^{-3}
V_0	initialt volumen af vandig fase i kontakt med jorden under adsorptionstesten	cm^3
v_a^A	volumen af den prøve, hvori prøvestoffet måles	cm^3
K_d	fordelingskoefficient for adsorption	$cm^3\ g^{-1}$
K_{oc}	normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof	$cm^3\ g^{-1}$
K_{om}	normaliseret fordelingskoefficient for organisk stof	$cm^3\ g^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlich adsorptionskoefficient	µg $^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$
1/n	Freundlich-eksponent	
D_{t_i}	desorptionsprocent til tidspunktet t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptionsprocent til tidsintervallet Δt_i	%
K_{des}	tilsyneladende desorptionskoefficient	$cm^3\ g^{-1}$
K_F^{des}	Freundlich desorptionskoefficient	µg $^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	masse af prøvestoffet desorberet fra jorden i løbet af tiden t_i	µg

Symbol	Definition	Enhed
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	masse af prøvestof desorberet fra jorden i løbet af tidsintervallet Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	masse af stof, som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	samlet masse af prøvestof desorberet ved desorptionsligevægt	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	masse af prøvestof, som stadig er adsorberet på jorden efter tidsintervallet Δt_i	µg
m_{aq}^{A}	masse af stof, som er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning	µg
$C_s^{des}(eq)$	indhold af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt	µg g^{-1}
$C_{aq}^{des}(eq)$	massekoncentration af prøvestof i vandig fase ved desorptionsligevægt	µg cm^{-3}
V_T	samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode	cm^3
V_R	rumfang supernatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning	cm^3
v_a^D	rumfang af prøve udtaget til analyse fra tidspunktet (i) under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode	cm^3
V_r^i	rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetikforsøget (parallelle metode)	cm^3
V_r^t	rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof, ved desorptionsligevægt	cm^3
MB	massebalance	%
m_E	samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglassets vægge i to trin	µg
V_{rec}	rumfang af supernatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionsligevægt	cm^3
P_{ow}	oktanol/vand fordelingskoefficient	
pKa	dissociationskonstant	
S_w	vandopløselighed	g l^{-1}

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Kendte rumfang af en opløsning af umærket eller radioaktivt mærket prøvestof med kendt koncentration i 0,01 M $CaCl_2$ tilsættes til jordprøver, hvis tørre vægt kendes, og som i forvejen er ekvilibreret i 0,01 M $CaCl_2$. Blandingen omrystes et passende stykke tid. Jordsuspensionerne adskilles derefter ved centrifugering og om ønsket filtrering, og den vandige fase analyseres. Den mængde prøvestof, som er adsorberet på jordprøven, beregnes som forskellen mellem den mængde prøvestof, som i begyndelsen er til stede i opløsningen og den mængde, der er tilbage ved forsøgets slutning (indirekte metode).

Om ønsket kan man vælge at bestemme den adsorberede mængde prøvestof direkte ved analyse af jorden (direkte metode). Denne metode, som indebærer trinvis ekstraktion af jorden med passende opløsningsmiddel, anbefales i tilfælde, hvor koncentrationsforskellen af stoffet i opløsningen ikke kan bestemmes nøjagtigt. Som eksempel på sådanne tilfælde kan nævnes: prøvestoffet adsorberes på overfladen af prøveglasset, prøvestoffet er ustabilt inden for forsøgets tidsramme, adsorptionen er enten så svag, at der kun fås lille koncentrationsændring i stoffet, eller så stærk, at koncentrationen bliver for lille til at kunne bestemmes nøjagtigt. Anvendes

radiomærket stof, kan ekstraktion af jorden undgås ved analyse af jordfasen ved forbrænding og væskescintillationstælling. Væskescintillationstælling er imidlertid en uspecifik teknik, som ikke gør det muligt at skelne mellem moderstof og omdannelsesprodukter; den bør derfor kun anvendes, hvis prøvestoffet er stabilt i hele undersøgelsens varighed.

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Kemiske reagenser skal være af analytisk kvalitet. Det anbefales at anvende umærket prøvestof med kendt sammensætning og helst mindst 95 % renhed eller radioaktivt mærket prøvestof af kendt sammensætning og radioaktiv renhed. Anvendes radioaktive tracerstoffer med kort halveringstid, skal der korrigeres for henfald.

Før man udfører en test for adsorption-desorption, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

a) vandopløselighed (A.6.)

b) damptryk (A.4.) og/eller Henry's lov konstant

c) abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH (C.7.)

d) fordelingskoefficient (A.8.)

e) umiddelbar biologisk nedbrydelighed (C.4.) eller aerob og anaerob omdannelse i jord

f) pKa for ioniserbare stoffer

g) direkte fotolyse i vand (dvs. UV-Vis absorptionsspektrum i vand, kvanteudbytte) og fotonedbrydning på jord.

1.6. PRØVENS ANVENDELIGHED

Prøven kan anvendes på kemiske stoffer, for hvilke en analysemetode med tilstrækkelig nøjagtighed er til rådighed. En vigtig parameter, som kan have betydning for resultaternes pålidelighed, navnlig ved anvendelse af den indirekte metode, er prøvestoffets stabilitet inden for det tidsrum, testen strækker sig over. Det er således en forudsætning, at stabiliteten efterprøves i en indledende undersøgelse; iagttages der en omdannelse i løbet af den tid, testen strækker sig over, anbefales hovedundersøgelsen udført med analyse af både jord- og vandfase.

Man kan komme ud for vanskeligheder med at udføre testen for prøvestoffer med ringe vandopløselighed ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), såvel som for stærkt ladede stoffer som følge af, at koncentrationen i den vandige fase ikke kan bestemmes analytisk med tilstrækkelig nøjagtighed. I sådanne tilfælde må der træffes supplerende foranstaltninger. Vejledning i, hvordan sådanne problemer gribes an, er givet i de pågældende afsnit i denne metode.

Ved testning af flygtige stoffer må der drages omsorg for at undgå tab under behandlingen.

1.7. BESKRIVELSE AF METODEN

1.7.1. **Apparatur og kemiske reagenser**

Standardlaboratorieudstyr, navnlig følgende:

a) Glas eller beholdere til udførelse af forsøgene. Det er vigtigt, at disse glas eller beholdere:

— passer direkte i centrifugen, for at fejl ved håndtering og overførsel kan begrænses til det mindst mulige

— er fremstillet af ikke-reaktive materialer, således at adsorptionen af prøvestoffet på overfladen nedsættes til det mindst mulige.

b) Til omrystning anvendes overhead-rystebord eller tilsvarende; rystebordet skal holde jorden opslæmmet under omrystningen.

c) Centrifuge: helst af højhastighedstypen, f.eks centrifugalkraft > 3 000 g, temperaturkontrolleret, skal kunne fjerne partikler med diameter over 0,2 µm fra vandige opløsninger. Beholderne skal være tilproppet under omrystning og centrifugering for at undgå tab ved fordampning og væskespild; for at mindske adsorptionen på propperne bør deaktiverede propper anvendes, f.eks. teflonbelagte skruepropper.

d) Valgfrit: filtreringsapparat, sterile engangsfiltre med 0,2 µm porestørrelse. Filtermaterialet bør udvælges særligt nøje med henblik på at undgå ethvert tab af prøvestof på filtrene; til tungtopløselige prøvestoffer kan filtre af organisk materiale ikke anbefales.

e) Analyseudstyr, som er velegnet til måling af prøvestoffets koncentration.

f) Laboratorievarmeskab, som kan holde temperaturer fra 103 °C til 110 °C.

1.7.2. **Karakterisering og udvælgelse af jord**

Jorden bør være karakteriseret ved tre parametre, som i hovedsagen anses for bestemmende for adsorptionskapaciteten: organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur, samt pH. Som allerede nævnt (jf. »Område«) kan andre fysisk-kemiske jordegenskaber have betydning for et givet stofs adsorption/desorption og bør i så fald tages i betragtning.

Det har meget stor betydning, hvilke metoder der anvendes til karakterisering af jorden, og disse kan have stor indflydelse på resultaterne. Det anbefales derfor, at jordens pH måles i en opløsning af 0,01 M $CaCl_2$ (dvs. den opløsning, der benyttes ved undersøgelse af adsorption/desorption) i henhold til den pågældende ISO-metode (ISO-10390-1). Ligeledes anbefales, at de øvrige relevante jordegenskaber bestemmes efter standardmetoder (ISO Handbook of soil analysis); derved kan analysen af sorptionsdata baseres på globalt standardiserede jordparametre. Nogen vejledning vedrørende foreliggende standardmetoder til jordanalyse og -karakterisering er givet i reference (50-52). Til kalibrering af metoderne til jordbundsanalyse anbefales brug af referencejordtyper.

Vejledning i udvælgelse af jord til adsorptions-/desorptionsforsøgene er givet i tabel 1. De syv udvalgte jordtyper er dem, man finder i tempererede geografiske områder. For ioniserbare stoffer bør de udvalgte jordtyper dække et bredt pH-område for at give mulighed for vurdering af adsorptionen af stoffet, når dette er henholdsvis ioniseret og uioniseret. Vejledning i, hvor mange forskellige jordtyper der skal undersøges i de forskellige trin af testen, findes under 14.9. »Testens præstationer«.

Foretrækker man andre jordtyper, bør de være karakteriseret ved de samme parametre og have tilsvarende variation i egenskaber som de, der er beskrevet i tabel 1, også selv om de ikke modsvarer kriterierne nøjagtigt.

TABEL 1: **Vejledning i valg af jordprøver til adsorption-desorption**

Jordtype	pH-område (i 0,01 M $CaCl_2$)	Organisk kulstofindhold (%)	Lerindhold (%)	Jordstruktur (1)
1	4,5-5,5	1,0-2,0	65-80	clay
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	clay loam
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	silt loam
4	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	loam
5	< 4.0-6,0 (2)	< 0,5-1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	loamy sand
6	> 7,0	< 0,5-1,0 (2) (3)	40-65	clay loam/clay
7	< 4,5	> 10	< 10	sand/loamy sand

(1) I henhold til FAO og US-systemet (85).

(2) Værdierne af de respektive variable bør fortrinsvis ligge i det anførte område. Hvis det imidlertid er vanskeligt at finde passende jordmateriale, kan værdier under den anførte mindsteværdi godtages.

(3) For jordtyper med mindre end 0,3 % organisk kulstof kan sammenhængen mellem organisk kulstofindhold og adsorption være forstyrret. Det anbefales således at anvende jord med et organisk kulstofindhold på mindst 0,3 %.

1.7.3. Indsamling og opbevaring af jordprøver

1.7.3.1. *Indsamling*

Der anbefales ikke bestemte prøveudtagningsmetoder eller -redskaber; prøveudtagningsmetoden afhænger af undersøgelsens formål (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Følgende bør tages i betragtning:

a) Udførlige oplysninger om områdets historie er nødvendige, herunder beliggenhed, plantedække, behandling med pesticider og/eller gødning, biologisk tilvækst eller tilfældig forurening. Anbefalingerne i ISO standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6) bør følges med hensyn til beskrivelse af prøvetagningsstedet.

b) Prøvetagningsstedet skal være fastlagt ved UTM (universel transversal Mercator-projektion/europæisk horisontal datum) eller geografiske koordinater; dette skulle gøre det muligt at genfinde en bestemt jordtype i fremtiden og kan være en hjælp ved bestemmelse af jorden efter forskellige klassifikationssystemer, som anvendes i andre lande. Endvidere må kun indsamles A-horisont til en maksimal dybde af 20 cm. Specielt gælder for jordtype n.7, at hvis en O_h horisont indgår i jorden, bør den medtages ved prøveindsamlingen.

Jordprøverne bør transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at der med sikkerhed ikke sker nævneværdige ændringer i jordens oprindelige egenskaber.

1.7.3.2. *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Kun når dette ikke er muligt, bør jorden opbevares ved rumtemperatur i lufttørret tilstand. Der anbefales ingen grænse for opbevaringstiden, men har jorden været opbevaret i over tre år, bør den før anvendelse genanalyseres for organisk kulstofindhold, pH og kationbytningskapacitet.

1.7.3.3. *Håndtering og klargøring af jordprøver til testen*

Jordprøverne lufttørres ved rumtemperatur (fortrinsvis ved 20-25 °C). Disaggregering bør foretages med mindst mulig kraft, således at den oprindelige jordstruktur ændres mindst muligt. Jordens sigtes til en partikelstørrelse ≤ 2 mm; ved sigtningen følges anbefalingerne i ISO-standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6). Skånsom homogenisering anbefales, da reproducerbarheden af resultaterne derved øges. Fugtindholdet i hver jordtype bestemmes på tre prøver ved opvarmning til 105 °C, indtil vægten ikke længere ændrer sig væsentligt (ca. 12 h). I alle beregninger forstås ved masse af jord den ovntørrede masse, dvs. jordens vægt korrigeret for fugtindhold.

1.7.4. Klargøring af prøvestof, som skal tilføres jorden

Prøvestoffet opløses i 0,01 M $CaCl_2$ i destilleret eller deioniseret vand: $CaCl_2$-opløsningen anvendes som vandig fase for at forbedre centrifugeringen og nedsætte kationbytningen til det mindst mulige. Stamopløsningens koncentration bør fortrinsvis være tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for den anvendte analysemetode. Denne grænse garanterer nøjagtige målinger med hensyn til de her anviste metoder; endvidere bør stamopløsningens koncentration være lavere end prøvestoffets opløselighed i vand.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles umiddelbart før stoffet tilføres jordprøverne og bør opbevares tillukket og mørkt ved 4 °C. Opbevaringstiden afhænger af prøvestoffets stabilitet og dets koncentration i opløsningen.

Kun ved tungtopløselige stoffer (S_w < 10^{-4} g l^{-1}) kan det være nødvendigt at anvende et passende opløsningsmiddel, når prøvestoffet er vanskeligt at bringe i opløsning. For dette opløsningsmiddel gælder: a) det bør være blandbart med vand, som f.eks. methanol eller acetonitril; b) dets koncentration bør ikke være større end svarende til 1 % af stamopløsningens samlede rumfang og bør være mindre i den opløsning af prøvestof, som kommer i kontakt med jorden (helst under 0,1 %), og c) det bør ikke være overfladeaktivt eller indgå i lyolytiske reaktioner med prøvestoffet. Brug af opløsningsmiddel bør være angivet og begrundet i rapporteringen af data.

Et andet alternativ ved tungtopløselige stoffer er at tilsætte prøvestoffet til prøvesystemet ved spiking: prøvestoffet opløses i et organisk opløsningsmiddel, og en lille del heraf tilsættes systemet bestående af jord og 0,01 molær opløsning af $CaCl_2$ i destilleret eller deioniseret vand. Indholdet af organisk opløsningsmiddel i den vandige fase skal holdes så lavt som muligt, normalt ikke over 0,1 %. Spiking fra en organisk opløsning kan være behæftet med manglende reproducerbarhed af volumen. Derved kan der indføres en ekstra fejlkilde i forsøget, da koncentrationen af prøvestof og hjælpeopløsningsmiddel ikke vil være den samme i alle test.

1.8. BETINGELSER FOR UDFØRELSE AF ADSORPTIONS-/DESORPTIONSTESTEN

1.8.1. Analysemetode

De vigtigste parametre, som kan påvirke nøjagtigheden af sorptionsmålingerne, er nøjagtigheden af analysemetoden anvendt til både opløsningsfase og adsorberet fase, prøvestoffets stabilitet og renhed, om sorptionsligevægt opnås, hvor meget opløsningens koncentration ændrer sig, forholdet jord/opløsning og ændringer i jordstrukturen under ekvilibreringen (35)(59-62). Nogle eksempler med relevans for nøjagtighedsproblematikken er givet i tillæg 2.

Pålideligheden af den anvendte analysemetode skal være kontrolleret i det koncentrationsområde, som forventes at optræde under testen. Eksperimentatoren bør ikke afholde sig fra selv at udvikle en velegnet metode med passende nøjagtighed, præcision, reproducerbarhed, detektionsgrænser og genfindingsgrad. Nedenfor er givet en forsøgsvejledning, som viser udførelsen af en sådan test.

Et passende rumfang 0,01 M $CaCl_2$, f.eks. 100 cm^3, omrystes i 4 h med en afvejet mængde jord, f.eks. 20 g, med stor adsoptionsevne, dvs. stort organisk kulstofindhold; der kan afviges fra de angivne vægtmængder og rumfang afhængigt af, hvad hensynet til analysen kræver, men et forhold jord/opløsning på 1:5 vil være et passende udgangspunkt. Blandingen centrifugeres, og den vandige fase kan eventuelt filtreres. Til den vandige fase tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøvestof, således at den nominelle koncentration når inden for det koncentrationsområde, der forventes at optræde under testen. Dette rumfang bør højst udgøre 10 % af den vandige fases endelige rumfang, for at forekvilibreringsopløsningens beskaffenhed skal ændres mindst muligt. Opløsningen analyseres.

Én blindprøve bestående af systemets jord + $CaCl_2$-opløsning (uden prøvestof) skal indgå i analysen, for at man kan kontrollere, om analysemetoden medfører artefakter, og om jorden giver matrixvirkninger.

Til sorptionsmåling kan anvendes gas-væskekromatografi (GLC), high-performance væskekromatografi (HPLC), spektrometri (f.eks. GC/massespektrometri, HPLC/massespektrometri) og væskescintillationstælling (ved radioaktivt mærket prøvestof). Uanset den anvendte analysemetode anses det for passende, hvis der genfindes mellem 90 % og 110 % af den nominelle værdi. For at give mulighed for detektion og evaluering efter at adskillelse af faserne har fundet sted, bør analysemetodens detektionsgrænser være mindst to størrelsesordener under den nominelle koncentration.

Karakteristika og detektionsgrænser for den analysemetode, der er til rådighed for adsorptionsundersøgelserne, spiller en vigtig rolle ved fastlæggelse af testbetingelserne og testens samlede præstationer. I denne metode angives en generel forsøgsgang, medens der gives anvisninger og vejledning for alternative løsninger, hvor analysemetode og laboratoriefaciliteter kan sætte begrænsninger.

1.8.2. Valg af optimalt jord/opløsning-forhold

Et passende jord til opløsning forhold for sorptionsundersøgelser vælges ud fra fordelingskoefficienten K_d og den ønskede relative adsorptionsgrad. Den statistiske nøjagtighed, med hvilken stoffets koncentration i opløsningen lader sig bestemme, er givet ved koncentrationsændringen for stoffet i opløsningen, afhængigt af adsorptionsligningens form og analysemetodens grænseværdi. I praksis er det derfor sædvanligvis nyttigt at bestemme sig for nogle få faste forhold, som giver en adsorptionsprocent på over 20 %, helst også > 50 % (62), samtidig med at man sørger for, at prøvestoffets koncentration i den vandige fase er høj nok til at kunne måles nøjagtigt. Dette er særlig vigtigt ved høje adsorptionsprocenter.

En bekvem måde at vælge passende jord/vand-forhold på er at basere det på en skønnet K_d-værdi, enten fra de indledende forsøg eller fra tilnærmet beregning med en anerkendt metode (tillæg 3). Derefter kan et passende forhold jord/opløsning vælges ved afsætte en kurve over dette forhold som funktion af K_d for fastlagte adsorptionsprocenter (fig.1). Ved optegning af kurven antages adsorptionsligningen lineær ([1]). Det pågældende forhold findes ved at omordne ligning 4 for K_d i samme form som ligning 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{ac}^{ads}(eq)$

eller i logaritmisk form, idet det forudsættes, at $R = m_{soil}/V_0$ og $A_{eq}\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad (2)$$

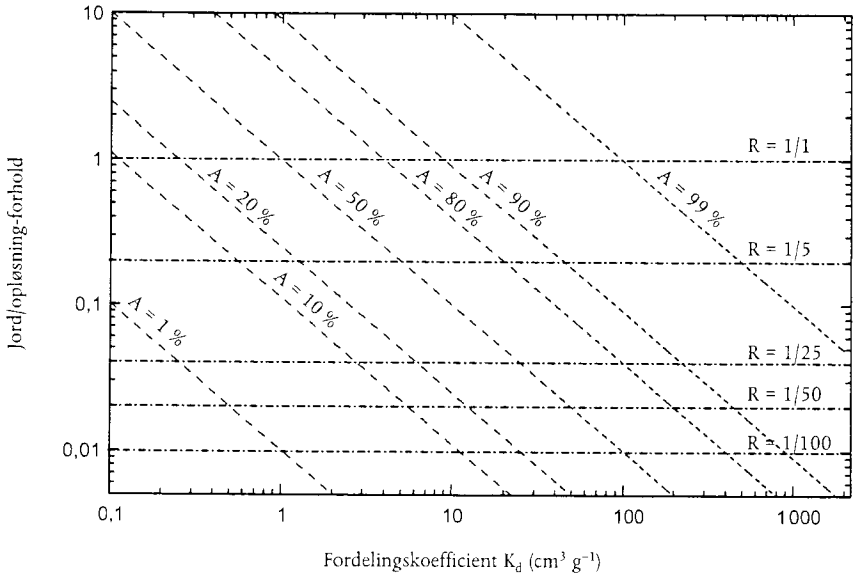


Fig. 1. Sammenhæng mellem forholdet jord/opløsning og K_d ved forskellige adsorptionsprocenter for prøvestof.

Fig. 1 viser det ønskede jord/opløsningsforhold som funktion af K_d ved forskellige adsorptionsgrader. F.eks. fås med et forhold jord/opløsning på 1:5 og K_d = 20 en adsorption på ca. 80 %. For at få 50 % adsorption ved samme K_d-værdi skal forholdet være 1:25. Denne måde at vælge passende jord/opløsningsforhold på giver undersøgeren den fleksibilitet, som er nødvendig under forsøgsomstændigheder.

Vanskeligere at håndtere er de områder, hvor det kemiske stof udviser enten meget høj eller meget lav adsorption. I tilfælde af lav adsorption anbefales et jord/opløsningsforhold på 1:1, dog kan det for visse meget organiske jordtyper være nødvendigt med et lavere forhold for at få en vællinglignende konsistens. Der må vises omhu med analysemetoden ved måling af små ændringer i opløsningens koncentration; ellers vil adsorptionsmålingen blive unøjagtig. Hvis fordelingskoefficienten K_d på den anden side er meget høj, kan man gå op til et forhold jord/opløsning på 1:100 for at en væsentlig del af det kemiske stof skal forblive i opløsningen. Der må dog sørges omhyggeligt for god opblanding, og man må give systemet tilstrækkelig tid til at ekvilibreres. En alternativ fremgangsmåde er at forudsige K_d-værdien med teknikker til skønsvis beregning, f.eks. baseret på P_{ow} værdier (tillæg 3). Især kan dette være nyttigt for lavt adsorberede/polære kemiske stoffer med $P_{ow} < 20$ og for lipofile/stærkt sorptive kemiske stoffer med $P_{ow} > 10^4$.

1.9. TESTENS PRÆSTATIONER

1.9.1. Testbetingelser

Alle forsøg udføres ved rumtemperatur, og om muligt ved konstant temperatur mellem 20 °C og 25 °C.

Centrifugeringsbetingelserne skal gøre det muligt at fjerne partikler større end 0,2 µm fra opløsningen. Denne værdi medtager den mindste partikel, der betragtes som en faststofpartikel, og danner overgangen mellem faste og kolloide partikler. Vejledning for fastlæggelse af centrifugeringsbetingelserne findes i tillæg 4.

Kan centrifugeringsfaciliteterne ikke garantere fjernelse af partikler over 0,2 µm, kan man eventuelt kombinere centrifugeringen med filtrering med filtre med 0,2 µm porestørrelse. Sådanne filtre skal være fremstillet af passende inaktivt materiale for at undgå tab af prøvestof på dem. Under alle omstændigheder skal det være godtgjort, at filtreringen ikke medfører tab af prøvestof.

1.9.2. **Trin 1 — Indledende undersøgelse**

Formålet med den indledende undersøgelse er beskrevet i afsnittet »Område«. Vejledning for opsætning af en sådan test gives i forbindelse med det nedenfor foreslåede forsøg.

1.9.2.1. *Valg af optimalt forhold jord/opløsning*

Der anvendes to jordtyper og tre forskellige jord/opløsning-forhold (seks enkeltforsøg). Den ene jordtype har højt organisk kulstofindhold og lavt lerindhold, medens den anden har lavt organisk kulstofindhold og højt lerindhold. Der foreslås følgende forhold:

— 50 g jord til 50 cm^3 vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:1)

— 10 g jord til 50 cm^3 vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:5)

— 2 g jord til 50 cm^3 vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:25).

Den mindste mængde jord, som forsøget kan gennemføres på, afhænger af laboratoriefaciliteterne og præstationerne af de anvendte analysemetoder. Dog anbefales det at anvende mindst 1 g, og helst 2 g for at få pålidelige resultater af testen.

Én kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (ingen jord), underkastes nøjagtig de samme procedurer som prøvesystemerne for at kontrollere prøvestoffets stabilitet i $CaCl_2$-opløsning og dets eventuelle adsorption på overfladen af prøvekarrene.

For hver jordtype gennemføres samme testprocedure på en blindprøve med samme jordmængde og et totalt rumfang på 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden prøvestof). Blindprøven tjener til baggrundskontrol under analysen med henblik på at opdage forstyrrende stoffer eller forurenet jord.

Alle forsøgene, herunder kontrol- og blindforsøg, skal udføres mindst som dobbeltforsøg. Det samlede antal prøver, som skal fremstilles til forsøget, kan beregnes ud fra den metode, der skal anvendes.

Sædvanligvis benyttes samme metoder ved forundersøgelsen og hovedundersøgelsen; undtagelser herfra nævnes i givet fald.

Dagen før forsøgsdagen ekvilibreres de lufttørrede jordprøver ved omrystning med et mindsterumfang på 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ natten over (12 h). Derefter tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøvestoffet, således at det endelige rumfang justeres til 50 cm^3. Dette tilsatte rumfang stamopløsning: a) må ikke være over 10 % af det endelige rumfang på 50 cm^3 af den vandige fase for ikke at ændre beskaffenheden af forekvilibreringsopløsningen mere end nødvendigt, og b) bør fortrinsvis resultere i, at den prøveopløsning, som er i kontakt med jorden (C_0), har en begyndelseskoncentration mindst to størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden; denne grænse sikrer, at der kan foretages nøjagtige målinger, selv når der optræder stærk adsorption (> 90 %), og giver mulighed for senere bestemmelse af adsorptionsisotermerne. Ligeledes anbefales det, at begyndelseskoncentrationen af det undersøgte stof (C_0) ikke er større end halvdelen af dets opløselighed.

Nedenfor er givet et eksempel på, hvordan stamopløsningens koncentration (C_{st}) beregnes. Det antages, at detektionsgrænsen er 0,01 µg cm^{-3}, og at adsorptionen er 90 %; begyndelseskoncentrationen af prøvestoffet, som er i kontakt med jorden, bør derfor helst være 1 µg cm^{-3} (to størrelsesordener over detektionsgrænsen). Når det forudsættes, at der tilsættes det anbefalede maksimale rumfang stamopløsning, dvs. 5 cm^3 til 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ ekvilibreringsopløsning (= 10 % stamopløsning i 50 cm^3 samlet vandigt rumfang), bør koncentrationen af stamopløsningen være 10 µg cm^{-3}, altså tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden.

pH af den vandige fase bør måles før og efter kontakt med jorden, da den spiller en vigtig rolle i hele adsorptionsprocessen, navnlig for ioniserbare stoffer.

Blandingen omrystes godt, indtil adsorptionsligevægt er nået. Ligevægtstiden i jord er stærkt varierende og afhænger af det kemiske stof og af jorden; et tidsrum på 24 h er sædvanligvis tilstrækkeligt (77). I forundersøgelsen kan prøverne udtages sekventielt gennem en omrystningsperiode på 48 h (f.eks. 4, 8, 24, 48 h). Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt under hensyntagen til laboratoriets arbejdsplan.

For analyse af prøvestoffet i den vandige opløsning er der to valgmuligheder: a) den parallelle metode og b) den sekventielle metode. Det må understreges, at skønt den parallelle metode er forsøgsmæssigt mere langstrakt, er den matematiske behandling af resultaterne enklere (tillæg 5). Hvilken metode man vil vælge, er imidlertid op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

a) Den parallelle metode: der fremstilles prøver med ens jordopløsning forhold, idet antal prøver skal være lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Efter centrifugering og (om ønsket) filtrering opsamles den vandige fase i første prøveglas så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 4 h, væsken i det andet prøveglas efter 8 h, i det tredje prøveglas efter 24 h osv.

b) Den sekventielle metode: der fremstilles kun en dobbeltprøve for hvert forhold jordopløsning. Ved fastlagte tidsintervaller centrifugeres blandingen for at skille faserne. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Filtreres der efter centrifugeringen, bør laboratoriet have de nødvendige faciliteter til filtrering af små vandige prøver. Det anbefales, at det samlede rumfang af de udtagne prøver ikke udgør over 1 % af opløsningens samlede rumfang, således at man ikke ændrer forholdet jordopløsning væsentligt og nedsætter massen af opløst stof, som er til rådighed for adsorption under testen.

Adsorptionsprocenten A_{t_i} beregnes for hvert tidspunkt (t_i) på grundlag af den nominelle begyndelseskoncentration og den målte koncentration på prøvetagningstidspunktet (t_i), korrigeret for blindværdien. Grafer over som A_{t_i} funktion af tiden (Fig. 1, tillæg 5) optegnes for at vurdere, om der er nået et ligevægtsplateau [1]). K_d-værdien ved ligevægt beregnes ligeledes. På grundlag af denne K_d-værdi vælges passende forhold jord/opløsning i fig. 1, således at adsorptionsprocenten kommer over 20 %, og helst > 50 % (61). Alle de pågældende ligninger og principper for grafisk afbildning er givet i afsnittet om data og rapportering i tillæg 5.

1.9.2.2. *Bestemmelse af ekvilibreringstid for adsorptionen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt*

Som nævnt giver grafer over A_{t_i} eller C_{aq}^{ads} som funktion af tiden mulighed for vurdere, om der er nået adsorptionsligevægt, samt den adsorberede mængde prøvestof ved ligevægt. Fig. 1 og 2 i tillæg 5 viser eksempler på sådanne afbildninger. Ekvilibreringstiden er den tid, systemet behøver for at nå et plateau.

Hvis der med en given jord ikke nås et plateau, men fås en konstant stigende værdi, kan det skyldes komplicerende faktorer som biologisk nedbrydning eller langsom diffusion. Biologisk nedbrydning kan påvises ved, at forsøget gentages med en steriliseret prøve af jorden. Hvis der heller ikke i dette tilfælde nås et plateau, bør eksperimentatoren søge efter andre fænomener, som kan tænkes at gøre sig gældende i netop hans undersøgelser; dette kan ske gennem passende ændringer af forsøgsbetingelserne (temperatur, omrystningstid, jord/opløsning-forhold). Det er op til eksperimentatoren at afgøre, om testen skal fortsættes, uanset at det måske ikke lykkes at nå ligevægt.

1.9.2.3. *Adsorption af prøvestof på overfladen af prøvebeholderne og prøvestoffets stabilitet*

Ved at analysere kontrolprøverne kan man skaffe sig en del oplysninger om prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt dets stabilitet. Hvis der iagttages en udtynding, som er større end svarende til middelfejlen på analysemetoden, kan der være tale om abiotisk nedbrydning og/eller adsorption på overfladen af prøveglassene. Man vil kunne skelne mellem disse to fænomener ved at vaske prøveglassets vægge grundigt med et kendt volumen af et passende opløsningsmiddel og derefter analysere vaskeopløsningen for prøvestoffet. Hvis der ikke konstateres adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene, er udtyndingen et bevis på abiotisk ustabilitet af prøvestoffet. Hvis der findes adsorption, må der anvendes prøveglas af andet materiale. De af dette forsøg afledte oplysninger om adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene kan imidlertid ikke overføres direkte til jord/opløsning-forsøget. Tilstedeværelsen af jord vil indvirke på denne adsorption.

Supplerende oplysninger om prøvestoffets stabilitet kan fås ved bestemmelse af massebalancen for moderstoffet i tid. Dette indebærer, at den vandige fase, ekstrakterne af jord samt prøvekammerets vægge analyseres for prøvestof. Forskellen mellem massen af tilsat prøvestof og summen af masserne af prøvestof i den vandige fase, ekstrakterne fra jord og fra prøveglassets vægge er lig den masse, som er nedbrudt og/eller fordampet og/eller ikke ekstraheret. For at massebalancen kan beregnes, bør der være nået adsorptionsligevægt inden for forsøgsperioden.

Massebalancen beregnes for begge jordprøver og for ét jord/opløsning-forhold for hver jordtype, som giver en udtynding over 20 %, og helst > 50 % ved ligevægt. Når forsøget til fastlæggelse af forholdet jord/opløsning er

([1]) Kurver over koncentrationen af prøvestof i den vandige fase (C_{aq}^{ads}) som funktion af tiden kunne også anvendes til at vurdere, om der nås et ligevægtsplateau (se fig. 2 i tillæg 5).

fuldført med analyse af den sidste prøve af den vandige fase efter 48 h, adskilles faserne ved centrifugering og, om ønsket, filtrering. Der opsamles så meget som muligt af den vandige fase, og til jorden tilsættes et passende ekstraktionsopløsningsmiddel (ekstraktionskoefficient mindst 95 %) for at ekstrahere prøvestoffet. Det anbefales at foretage mindst to på hinanden følgende ekstraktioner. Mængden af prøvestof i ekstrakterne fra jord og prøveglas bestemmes, og massebalancen beregnes (ligning 10, data og rapportering). Hvis den er mindre end 90 %, regnes prøvestoffet for ustabilt inden for testperioden. Undersøgelserne kan dog i så tilfælde fortsættes, idet der tages hensyn til prøvestoffets ustabilitet; det anbefales da at analysere begge faser i hovedundersøgelsen.

1.9.3. Trin 2 — Adsorptionskinetik ved én prøvestofkoncentration

Der anvendes fem jordtyper, udvalgt fra tabel 1. Det vil være en fordel, hvis nogle af eller alle de anvendte jordtyper fra forundersøgelsen i givet fald er med blandt disse fem jordtyper. Derved undgår man at gentage trin 2 for de jordtyper, der er anvendt i forundersøgelsen.

Ekvilibreringstiden, forholdet jord/opløsning, jordprøvens vægt, rumfanget af vandig fase i berøring med jorden og prøvestoffets koncentration i opløsningen vælges på grundlag af resultaterne af forundersøgelsen. Analyse bør helst finde sted efter ca. 2, 4, 6, 8 (eventuelt også 10) og 24 h kontakttid; omrystningstiden kan strækkes til højst 48 h i tilfælde af, at prøvestoffet kræver længere ekvilibreringstid ud fra de resultater, der danner grundlag for fastlæggelse af opblandingsforholdet. Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt.

Hvert forsøg (ét med jord og ét med opløsning) gennemføres mindst som dobbeltforsøg for at resultaternes overensstemmelse kan vurderes. I hvert forsøg skal indgå én blindprøve. Denne består af jord og 0,01 M $CaCl_2$ opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og rumfang identisk med forsøgets. En kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden jord) underkastes samme testprocedure for at sikre mod det uventede.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt A_{t_i} og/eller tidsinterval $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af behov) og afsættes mod tiden. Desuden beregnes fordelingskoefficienten K_d ved ligevægt og den normaliserede adsorptionskoefficient K_{oc} for organisk kulstof (for upolære organiske stoffer).

Resultaterne af adsorptionskinetikforsøget

Den lineære K_d-værdi giver sædvanligvis en nøjagtig beskrivelse af sorptionsforholdene i jord (35)(78) og er et udtryk for den iboende mobilitet af kemiske stoffer i jord. For eksempel anses kemiske stoffer med $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} sædvanligvis for kvalitativt mobile. Tilsvarende har MacCall et al. (16) opstillet et system til opdeling efter mobilitet, baseret på K_{oc}-værdier. Endvidere findes der klassifikationssystemer for udvaskning, baseret på sammenhængen mellem K_{oc} og DT-50 ([1]) (32)(79).

I henhold til fejlanalyseundersøgelser (61) kan K_d-værdier under 0,3 cm^3 g^{-1} desuden ikke beregnes nøjagtigt ud fra et fald i koncentrationen i den vandige fase, selv når der anvendes det (fra en nøjagtighedssynsvinkel) gunstigste forhold jord/opløsning, dvs. 1:1. I så tilfælde anbefales det analysere begge faser — jord og opløsning.

Vedrørende ovenstående bemærkninger anbefales det, at undersøgelsen af adsorptionsforholdene for et kemisk stof i jord og dets potentielle mobilitet fortsættes med bestemmelse af Freundlich adsorptionsisotermer for disse systemer, for hvilke K_d kan bestemmes nøjagtigt ved brug af forsøgsprotokollen i denne testmetode. Nøjagtig bestemmelse er mulig, såfremt multiplikation af K_d med forholdet jord/opløsning giver en værdi > 0,3, når målingerne baseres på koncentrationsfaldet i den vandige fase (indirekte metode), hhv. > 0,1 når begge faser analyseres (direkte metode) (61).

1.9.4. Trin 3 — Adsorptionsisotermer og desorptionskinetik/desorptionsisotermer

1.9.4.1. *Adsorptionsisotermer*

Der anvendes fem prøvestofkoncentrationer, helst således at de spænder over to størrelsesordener; valg af disse koncentrationer bør ske på grundlag af vandopløseligheden og den resulterende ligevægtskoncentration i vand. For hver jordtype bør anvendes samme forhold jord/opløsning i hele undersøgelsen. Adsorptionstesten udføres som ovenfor beskrevet, blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang efter forløb af den nødvendige tid til indtræden af ligevægt som tidligere bestemt i trin 2. Ligevægtskoncentrationerne i opløsnin-

([1]) DT-50: den tid, der forløber, til 50 % af prøvestoffet er nedbrudt.

gen bestemmes, og den adsorberede mængde beregnes enten ud fra svindet af prøvestof i opløsningen eller ved hjælp af den direkte metode. Den adsorberede masse pr. masseenhed jord afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet (se »Data og rapportering«).

Resultater af bestemmelsen af adsorptionsisotermer

Af de matematiske adsorptionsmodeller, som hidtil er foreslået, er Freundlich-isotermen den oftest anvendte til beskrivelse af adsorptionsprocesser. Mere udførlige oplysninger om fortolkning og betydning af adsorptionsmodeller er givet i reference (41)(45)(80)(81)(82).

Bemærkning: Det skal nævnes, at man ikke kan sammenholde værdierne af K_F (Freundlich adsorptionskoefficienten) for forskellige stoffer, medmindre de pågældende K_F -værdier udtrykkes i samme enheder (83).

1.9.4.2. *Desorptionskinetik*

Formålet med dette forsøg er at undersøge, om et kemisk stof adsorberes reversibelt eller irreversibelt til en jordtype. Denne oplysning er vigtig, da også desorptionsprocessen spiller en vigtig rolle for et kemisk stofs opførsel i jord på en given lokalitet. Desuden er desorptionsdata nyttige som inddata for computermodeller af et stofs udvaskning og afstrømning i opløst form. Ønskes en desorptionsundersøgelse, anbefales det at udføre nedenstående undersøgelse på hvert system, for hvilket det var muligt at bestemme K_d nøjagtigt i det foregående adsorptionskinetikforsøg.

Ligesom for adsorptionskinetikundersøgelsen kan der vælges: a) den parallelle metode og b) den sekventielle metode. Valg af metode er op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

a) Den parallelle metode: for hver jordtype, som udvælges til desorptionsundersøgelsen, fremstilles prøver med ens jord/opløsning forhold, således at antal prøver er lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Tidsintervallerne bør helst være de samme som i adsorptionskinetikforsøget; dog kan den samlede tid om nødvendigt forlænges, for at systemet kan nå desorptionsligevægt. I hvert forsøg (én jordtype, én opløsning), køres én blindprøve. Blindprøven består af jord og 0,01 M $CaCl_2$-opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og volumen identisk med forsøgets. Som kontrolprøve underkastes prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden jord) samme testprocedure. Alle blandingerne af jord og opløsning omrystes, til adsorptionsligevægt er nået (som tidligere bestemt i trin 2). Derefter adskilles faserne ved centrifugering, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ uden prøvestof, og de nye blandinger omrystes igen. Den vandige fase i første prøveglas opsamles så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 2 h, væsken i det andet prøveglas efter 4 h, i det tredje prøveglas efter 6 h, osv., indtil desorptionsligevægt er nået.

b) Den sekventielle metode: efter adsorptionskinetikforsøget centrifugeres blandingen, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ uden prøvestof. Den nye blanding omrystes, indtil desorptionsligevægt er nået. I dette tidsrum centrifugeres blandingen ved fastlagte tidsintervaller, så faserne adskilles. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Rumfanget af hver enkelt prøve skal være mindre end 1 % af det samlede rumfang. Der tilsættes samme mængde frisk fremstillet 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til blandingen for at bevare uændret forhold mellem jord og opløsning, og omrystningen fortsætter indtil næste tidsinterval.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt (D_t) og/eller tidsinterval ($D_{\Delta t}$) (afhængigt af, hvad undersøgelsen kræver) og afsættes mod tiden. Desorptionskoefficienten K_{des} ved ligevægt beregnes ligeledes. Alle de ligninger, som skal anvendes, er givet i afsnittet »Data og rapportering« og i tillæg 5.

Resultater af desorptionskinetikforsøget

Fælles afbildninger af desorptionsprocenten D_t og adsorptionsprocenten A_t som funktion af tiden giver mulighed for at at vurdere adsorptionsprocessens reversibilitet. Hvis desorptionsligevægt nås, selv om det tager dobbelt så lang tid som at nå adsorptionsligevægt, og hvis den samlede desorption udgør over 75 % af den adsorberede mængde, anses adsorptionen for reversibel.

1.9.4.3. *Desorptionsisotermer*

Freundlich-desorptionsisotermer bestemmes for de jordtyper, som anvendes i forsøget til bestemmelse af adsorptionsisotermer. Desorptionstesten udføres som beskrevet i afsnittet »Desorptionskinetik«, blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang, ved desorptionsligevægt. Den samlede masse desorberet prøvestof beregnes. Indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet i opløsningen (se »Data og rapportering« samt tillæg 5).

2. DATA OG RAPPORTERING

Analysedata fremlægges i tabelform (se tillæg 6). Enkeltmålinger og beregnede gennemsnit angives. Der gives grafiske fremstillinger af adsorptionsisotermerne. Beregningerne foretages som nedenfor beskrevet.

I forsøget sættes vægten af 1 cm^3 vandig opløsning til 1 g. Forholdet jord/opløsning kan angives i enheder w/w eller w/vol med samme talværdi.

2.1. ADSORPTION

Adsorptionen (A_{t_i}) defineres som den procentdel af det fra forsøgets begyndelse tilstedeværende stof, som adsorberes på jorden under de givne forsøgsbetingelser. Såfremt prøvestoffet er stabilt og ikke i nævneværdig grad adsorberes til beholderens væg, beregnes adsorptionsprocenten A_{t_i} til hvert af tidspunkterne t_i efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \qquad (3)$$

hvor:

A_{t_i} = adsorptionsprocent til tiden t_i (%)

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden til tiden t_i (µg)

m_0 = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (µg).

Udførlige oplysninger om, hvordan den procentuelle adsorption A_{t_i} beregnes ved brug af den parallelle og sekventielle metode, findes i tillæg 5.

Fordelingskoefficienten K_d er forholdet mellem indholdet af stoffet i jordfasen og massekoncentrationen af stoffet i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af ligevægt.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

hvor:

$C_s^{ads}(eq)$ = indhold af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (µg g^{-1})

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massekoncentration af stof i vandig fase ved adsorptionsligevægt (µg cm^{-3}). Koncentrationen bestemmes ved analyse under hensyntagen til resultaterne af blindprøverne

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (µg)

m_{soil} = mængde jordfase, angivet som tør masse af jord (g)

V_0 = begyndelsesrumfang af vandig fase i kontakt med jorden (cm^3).

Forholdet mellem A_{eq} og K_d er givet ved:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

hvor:

A_{eq} = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt, %.

Den normaliserede adsorptionskoefficient for organisk kulstof K_{oc} angiver sammenhængen mellem fordelingskoefficienten K_d og jordprøvens organiske kulstofindhold:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

hvor:

% oc = procentdel organisk kulstof i jordprøven (g g^{-1}).

K_{oc}-koefficienten angiver ved én enkelt værdi fordelingen af hovedsagelig ikke-polære organiske stoffer mellem organisk kulstof i jord eller slam og vand. Adsorptionen af sådanne kemiske stoffer er korreleret med det organiske indhold af det sorberende faste stof (7); således afhænger K_{oc}-værdierne af de særlige karakteristika af humusfraktionerne, hvis sorptionsevne afviger betydeligt som følge af forskelle i oprindelse, tilblivelse osv.

2.1.1. Adsorptionsisotermer

Freundlich-adsorptionsisotermligningen giver sammenhængen mellem den adsorberede mængde prøvestof og koncentrationen af opløst prøvestof ved ligevægt (ligning 8).

Data behandles som angivet under »Adsorption«, og for hvert prøveglas beregnes indholdet af prøvestof adsorberet på jorden efter adsorptionstesten ($C_s^{ads}(eq)$) (andetsteds betegnet x/m). Det antages, at der er indtrådt ligevægt, og at $C_s^{ads}(eq)$ udtrykker ligevægtsværdien:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlich-adsorptionsligningen er vist i (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

hvor:

K_F^{ads} = Freundlich-adsorptionskoefficient; den har kun dimensionen $cm^3\ g^{-1}$, såfremt 1/n = 1; i alle andre tilfælde indføres hældningen 1/n i dimensionen af K_F^{ads} $(\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n}\ g^{-1})$

n = regressionskonstant; 1/n ligger sædvanligvis i intervallet 0,7-1,0, hvilket viser, at sorptionsdata ofte er let ulineære.

Ligning 8 og 9 afsættes, og værdierne af K_F^{ads} og 1/n beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 9. Korrelationskoefficienten r^2 for den logaritmiske ligning beregnes ligeledes. Et eksempel på sådanne afbildninger er givet i fig. 2.

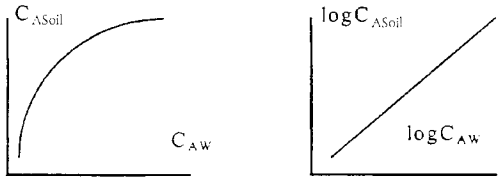


Fig. 2. Freundlich adsorptionskurve, normal og lineariseret.

2.1.2. **Massebalance**

Massebalancen (MB) defineres som den procentdel af den nominelle mængde stof ved testens begyndelse, som kan genfindes analytisk efter en adsorptionstest.

Behandlingen af data vil afvige, hvis det opløste stof er fuldstændig blandbart med vand. For opløsningsmidler blandbare med vand kan man ved at behandle data som beskrevet under »Desorption« bestemme den mængde stof, som genfindes ved ekstraktion med opløsningsmiddel. Er opløsningsmidlet mindre blandbart med vand, må den genfundne mængde bestemmes.

Beregning af massebalancen MB for adsorption: leddet (m_E) antages at svare til den samlede masse prøvestof ekstraheret af jorden og fra prøveglassets overflade med organisk opløsningsmiddel:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

hvor:

MB = massebalance (%)

m_E = samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglassets vægge i to trin (µg)

C_0 = initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden (µg cm^{-3})

V_{rec} = rumfang supernatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionsligevægt (cm^{-3}).

2.2. DESORPTION

Desorptionen (D) defineres som den procentdel af den tidligere adsorberede stofmængde, som desorberes under forsøgsbetingelserne:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \ (\%) \qquad (11)$$

hvor:

D_{t_i} = desorptionsprocent til tidspunktet t_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof desorberet fra jorden til tiden t_i (µg)

$m_s^{des}(eq)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden ved adsorptionsligevægt (µg).

Udførlige oplysninger om, hvordan desorptionsprocenten D_{t_i} beregnes ved brug af den parallelle og sekventielle metode, er givet i tillæg 5.

Den tilsyneladende desorptionskoefficient (K_{des}) er forholdet mellem indholdet af resterende stof i jordfasen og massekoncentrationen af desorberet stof i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af desorptionsligevægt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (12)$$

hvor:

K_{des} = desorptionskoefficient ($cm^3 \ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = samlet masse af prøvestof desorberet fra jorden ved desorptionsligevægt (µg)

V_T = samlet masse af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget (cm^3).

Vejledning for beregning af $m_{aq}^{des}(eq)$ findes i tillæg 5 under overskriften »Desorption«.

Bemærkning:

Hvis den efterfølgende adsorptionstest blev udført med den parallelle metode, sættes rumfanget V_T i ligning 12 lig V_0.

2.2.1. Desorptionsisotermer

Freundlich-ligningen for adsorptionsisotermer udtrykker sammenhængen mellem den mængde prøvestof, som stadig er absorberet på jorden, og koncentrationen af prøvestof ved desorptionsligevægt (ligning 16).

For hvert prøveglas beregnes indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, på følgende måde:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ defineres som:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

hvor:

$C_s^{des}(eq)$ = indhold af prøvestof, som ved desorptionsligevægt stadig er adsorberet til jorden (µg g^{-1})

$m_m^{des}(eq)$ = masse af stof, som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt (µg)

m_{aq}^A = masse af prøvestof, som på grund af ufuldstændig volumenudskiftning er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægtt (µg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (µg)

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = rumfang opløsning, som ved desorptionsligevægt er udtaget af prøveglasset med henblik på bestemmelse af prøvestof (cm^3)

V_R = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (cm^3).

Freundlich-desorptionsligningen er vist i (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

hvor:

K_F^{des} = Freundlich-desorptionskoefficient

n = regressionskonstant

$C_{aq}^{des}(eq)$ = massekoncentration af stof i vandig fase ved desorptionsligevægt (µg cm^{-3}).

Ligningerne 16 og 17 kan afsættes grafisk, og værdien af K_F^{des} og 1/n beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 17.

Bemærkning:

Hvis Freundlich adsorptions- eller desorptionseksponenten 1/n er lig 1, vil Freundlich-bindingskonstanten for adsorption eller desorption (K_F^{ads} og K_F^{des}) være lig ligevægtskonstanterne (K_d og K_{des}) for henholdsvis adsorption og desorption, og ved afbildning af C_s mod C_{aq} fås en ret linje. Er eksponenterne forskellige fra 1, bliver en afbildning af C_s som funktion af C_{aq} ulineær, og adsorptions- og desorptionskonstanterne vil ændre sig langs isotermerne.

2.2.2. **Testrapport**

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

— fuldstændig identifikation af de anvendte jordprøver, med angivelse af:

  — stedsbestemmelse for lokaliteten (bredde og længde)

  — prøveindsamlingsdato

  — anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.)

  — dybde af prøvetagning

  — sand-/silt-/lerindhold

  — pH-værdi (i 0,01 M $CaCl_2$)

  — organisk kulstofindhold

  — indhold af organisk stof

  — kvælstofindhold

  — C/N-forhold

  — kationbytningskapacitet (mmol/kg)

  — udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver

  — når det er hensigtsmæssigt, alle relevante oplysninger til fortolkning af prøvestoffets adsorption/desorption

  — henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter

— oplysninger om prøvestoffet, hvis det er hensigtsmæssigt

— forsøgstemperaturen

— centrifugeringsbetingelser

— analysemetode anvendt til analyse af prøvestoffet

— begrundelse af enhver brug af opløsningsmiddel til fremstilling af stamopløsningen af prøvestoffet

— forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne

— data i henhold til formularbladet (tillæg 6) og grafiske fremstillinger

alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af testresultaterne.

3. LITTERATURHENVISNINGER

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), 'Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils', in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), 'Adsorption-Desorption Phenomena' in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), 'The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), 'An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media'. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), 'Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis', in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), 'Movement and sorption of chemicals applied to the soil'. Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) 'Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils'. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. H., (1995), 'Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil' in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), 'Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides', IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), 'Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils'. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), 'Persistence of herbicides in soil'. J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), 'Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption'. Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), 'Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides'. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), 'Process affecting herbicide action in soil'. Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), 'Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden'. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), 'The interpretation of soil leaching experiments', in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172. Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), 'Pesticide mobility in soils'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), 'Diffusion and volatilization' in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), 'Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system'. Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), 'Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability'. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). 'Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils'. J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), 'Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils'. Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), 'Sorption estimates for modeling', in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), 'Functional relationship between sorption in soil and chemical structure'. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

(37) Hance R. J., (1969), 'An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils'. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), 'Molecular structure of herbicides and their sorption by soils'. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). 'Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), 'Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology'. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), 'Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil'. Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), 'Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), 'Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners'. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), 'Adsorption in organic chemicals' in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, 'Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils'. Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), 'Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils'. Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), 'Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations' in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980). 'Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase', CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag. Stuttgart (1982). 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. 'Methods of Soil Analysis'. Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), 'Precision in pesticide adsorption measurements'. Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), 'Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine'. Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system'. Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106'. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), 'Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique'. Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), 'Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments'. J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), 'Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water'. Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), 'Sorption of organic substances by soils and sediments'. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C., (1987), 'Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons'. Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J. , Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). 'Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota' in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), 'A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds'. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. L., Wood S. G., and Means J. C., (1981), 'Sorption of β-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption'. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), 'Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité'. Revue de l'Agric., 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), 'Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil'. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), 'HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test'. Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), 'HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases'. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), 'The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides'. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), 'The retention processes: mechanisms' in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), 'Interpretation and use of sorption isotherms' in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), 'Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils'. J. Chem. Soc., pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), 'Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption'. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

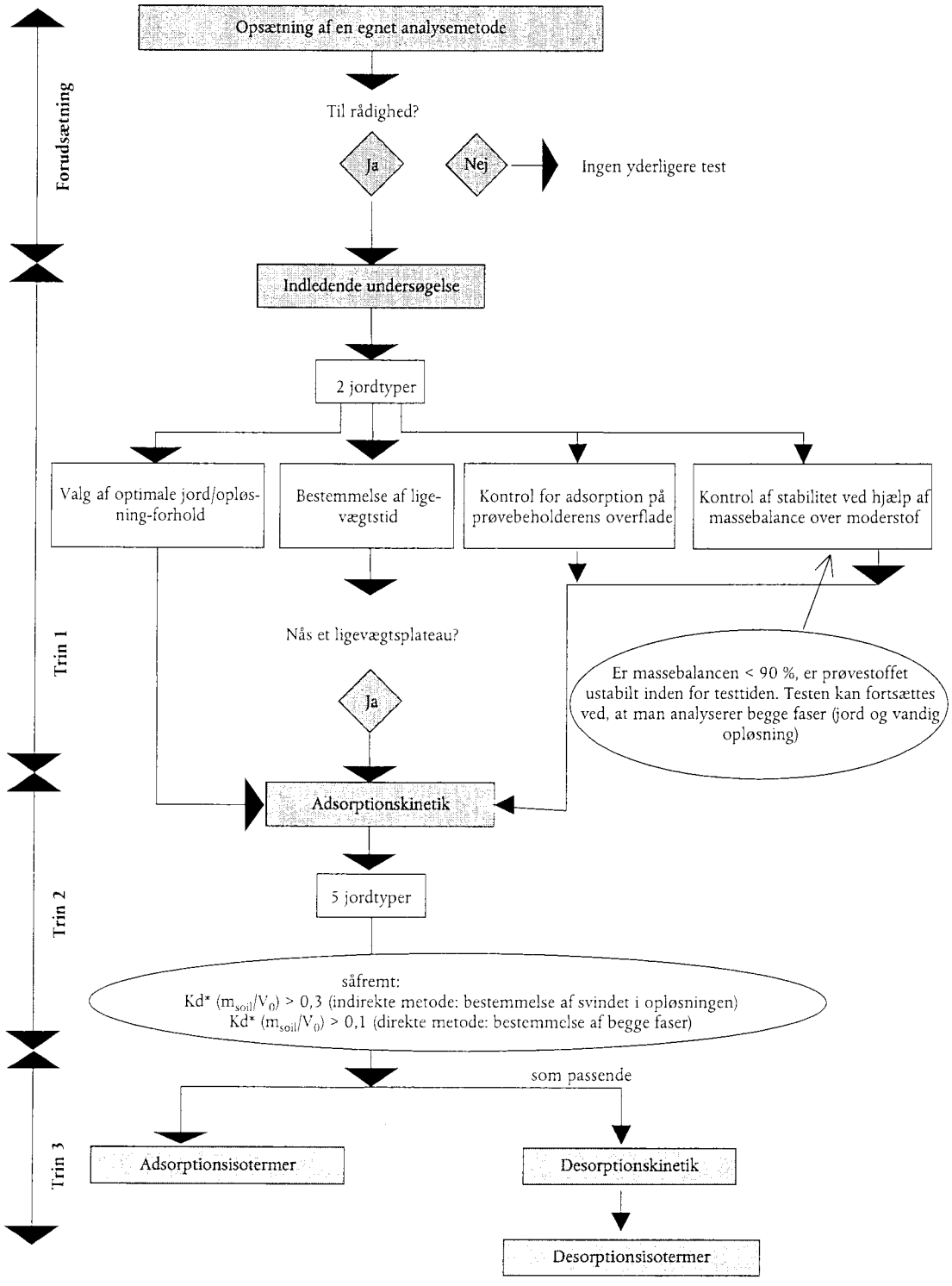
(83) Bedbur E., (1996), 'Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

(84) Guth, J. A., (1985), 'Adsorption/desorption', in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

TILLÆG 1

TESTPLAN



TILLÆG 2

BETYDNINGEN AF ANALYSEMETODENS NØJAGTIGHED OG KONCENTRATIONSÆNDRINGER FOR ADSORPTIONSRESULTATERNES NØJAGTIGHED

Af følgende tabel (84) ses, at når der er meget lille forskel mellem prøvestoffets begyndelsesmasse (m_0 = 110 µg) og ligevægtsmasse (m_{aq}^{ads}(eq) = 100 µg) i opløsningen, vil en fejl på 5 % på ligevægtskoncentrationsmålingen føre til en fejl på 50 % på beregningen af den stofmængde, som er adsorberet på jorden (m_s^{ads} (eq)) og på 52,4 % på beregningen af K_d.

Mængde jord m_{jord} = 10 g
Opløsningens rumfang V_0 = 100 cm^3

	m_{aq}^{ads}(eq) (µg)	C_{aq}^{ads}(eq) (µg cm^{-3})	R	(m_s^{ads}(eq)* (µg)	C_s^{ads}(eq)* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	FOR A = 9 %							
m_0 = 110 µg eller C_0 = 1,100 µg/cm^3	100	1,000	sand værdi	10	1,00	sand værdi	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	FOR A = 55 %							
m_0 = 110 µg eller C_0 = 1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	sand værdi	60,0	6,00	sand værdi	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	FOR A = 99 %							
m_0 = 110 µg eller C_0 = 1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	sand værdi	108,9	10,89	sand værdi	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

Hvor:

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq)$, $C_s^{ads}(eq) = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)]\ V_0}{m_{soil}}$, $K_d = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

m_s^{ads} (eq) = masse af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, µg

m_{aq}^{ads} (eq) = masse af prøvestof i vandfasen ved ligevægt, µg

C_s^{ads} (eq) = indhold af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, µg g^{-1}

C_{aq}^{ads} (eq) = massekoncentration af prøvestoffet i vandig fase ved ligevægt, µg cm^{-3}

R = analysefejl på bestemmelse af m_{aq}^{ads}(eq)

R‡ = beregnet fejl som følge af analysefejl R.

TILLÆG 3

TEKNIKKER TIL SKØNSMÆSSIG BEREGNING AF K_d

1. Ved hjælp af teknikker til skønsmæssig beregning kan størrelsen af K_d forudsiges på grundlag af korrelationer med f.eks. værdier af P_{ow} (12)(39)(63-68), vandopløselighedsdata (12)(19)(21)(39)(68-73) eller polaritetsdata afledt ved brug af omvendt fase HPLC (74-76). Som vist i tabel 1 og 2 beregnes K_{oc} eller K_{om} og dermed indirekte K_d af ligningerne:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Princippet om disse korrelationer hviler på to forudsætninger: (1) et stofs adsorption er hovedsagelig bestemt af jordens organiske stofindhold, og (2) de indgående vekselvirkninger er hovedsagelig af ikke-polær art. For disse korrelationer gælder følgelig: (1) de gælder ikke eller kun i nogen udstrækning for polære stoffer, og (2) de gælder ikke ved meget lille organisk stofindhold i jorden (12). Desuden gælder, at skønt der er fundet tilfredsstillende korrelation mellem P_{ow} og adsorptionen (19), kan det samme ikke siges om forholdet mellem vandopløselighed og adsorptionsgrad (19)(21); undersøgelser heraf har hidtil givet meget modstridende resultater.

3. Nogle eksempler på korrelationen mellem adsorptionskoefficient og oktanol-vand fordelingskoefficient samt vandopløselighed er givet henholdsvis i tabel 1 og 2.

Tabel 1. Eksempler på korrelation mellem adsorptionsfordelingskoefficienten og oktanol-vand fordelingskoefficienten; flere eksempler er givet i (12) og (68)

Stoffer	Korrelation	Forfatter
Substituerede urinstoffer	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatiske klorerede	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65)
Forskellige pesticider	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66)
Aromatiske carbonhydrider	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles og Mantoura (1987) (67)

Tabel 2. Eksempler på korrelationen mellem adsorptionsfordelingskoefficient og vandopløselighed; flere eksempler er givet i (68) og (69)

Stoffer	Korrelation	Forfatter
Forskellige pesticider	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66)
Alifatiske og aromatiske klorerede forbindelser	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
α-naphtol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cykliske, alifatiske og aromatiske stoffer	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Forskellige forbindelser	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

TILLÆG 4

BEREGNINGER TIL FASTLÆGGELSE AF CENTRIFUGERINGSBETINGELSER

1. Centrifugeringstiden er givet ved følgende formel, idet partiklerne forudsættes at være kugleformede:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

For enkelhedens skyld er alle parametre angivet i ikke-SI enheder (g, cm).

hvor:

ω = rotationshastighed (=2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = omdrejninger pr. minut

η = opløsningens viskositet, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = partikelradius, cm

ρ_s = massefylde af jord, g cm^{-3}

ρ_{aq} = massefylde af opløsning, g cm^{-3}

R_t = afstand fra centrum af centrifugerotoren til overfladen af opløsningen i centrifugeglasset, cm

R_b = afstand fra centrum af centrifugerotoren til bunden i centrifugeglasset, cm

R_b-R_t = længde af jord/opløsning-blandingen i centrifugeglasset, cm.

I praksis fordobler man sædvanligvis de beregnede tider for at sikre fuldstændig separation.

2. Ligning 1 kan forenkles yderligere, hvis opløsningens viskositet (η) og massefylde (ρ_{aq}) sættes lig viskositeten og massefylden af vand ved 25 °C, altså $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1}, og $\rho_{aq} = 1{,}0$ g cm^{-3}.

Centrifugeringstiden er da givet ved ligning 2:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Af ligning 2 ses, at to parametre er vigtige ved fastlæggelse af centrifugeringsbetingelserne, nemlig tid (t) og hastighed (rpm), når man vil udskille partikler med en given størrelse (i vort tilfælde radius 0,1 µm): (1) jordens massefylde og (2) længden af blandingen i centrifugeglasset (R_b-R_t), dvs. den distance, som en jordpartikel tilbagelægger fra overfladen af opløsningen til glassets bund; for et givet rumfang er det klart, at længden af blandingen i røret bestemmes af kvadratet på rørets radius.

4. Fig. 1 viser sammenhængen mellem centrifugeringstiden (t) og centrifugeringshastigheden (rpm) for forskellige jordmassefylder (ρ_s) (Fig. 1a) og forskellige længder af blandingen i centrifugeglassene (Fig. 2a). Af fig. 1a ses betydningen af jordens massefylde tydeligt; for en typisk centrifugeringshastighed på 3 000 rpm er centrifugeringstiden ca. 240 min. for jord med massefylde 1,2 g cm^3 men kun 50 min., når massefylden er 2,0 g cm^3. Tilsvarende ses af fig. 1b, at for en typisk centrifugeringshastighed på 3 000 rpm er centrifugeringstiden ca. 50 min. for en længde af blandingen på 10 cm, men kun 7 min. for en længde på 1 cm. Det er imidlertid vigtigt at finde et optimalt forhold mellem den centrifugering, som kræver mindst mulig længde, og den, som gør det let for eksperimentatoren at adskille faserne efter centrifugering.

5. Ved fastlæggelse af forsøgsbetingelserne med henblik på adskillelse af fast og flydende fase er det desuden vigtigt at tage hensyn til eventuel tilstedeværelse af en tredje »pseudo«-fase, kolloiderne. Disse partikler, der er under 0,2 µm, kan i væsentlig grad påvirke hele absorptionsmekanismen for et stof i en jordsuspension. Når der centrifugeres som ovenfor beskrevet, forbliver kolloiderne i den vandige fase og bliver analyseret sammen med den vandige fase. Derfor går oplysningerne om deres indflydelse tabt.

   Hvis det laboratorium, som forestår undersøgelsen, har faciliteter til ultracentrifugering eller ultrafiltrering, kan adsorption/desorption af et stof i jord undersøges mere tilbundsgående, herunder stoffets adsorption på kolloiderne. I så tilfælde bør der anvendes ultracentrifugering ved 60 000 rpm eller ultrafiltrering med en filterporøsitet på 100 000 Dalton til at adskille de tre faser jord, kolloider og opløsning. Den forsøgsprotokol bør desuden ændres tilsvarende, således at alle tre faser analyseres for stoffet.

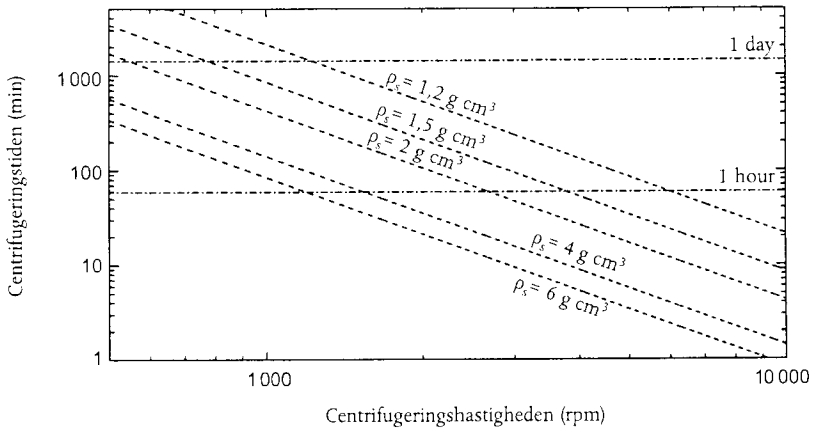


Fig. 1a. Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centrifugeringshastighed (rpm) ved forskellige jordmassefylder (ρ_s).
R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} og ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} ved 25 °C.

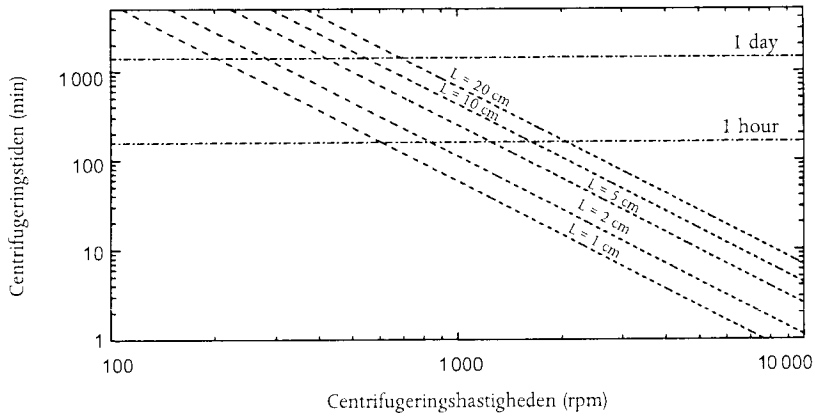
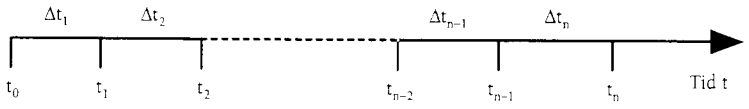


Fig. 1b. Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centifugeringshastighed (rpm) for forskellige længder af blandingen i centrifugeglasset (R_b-R_t) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} ved 25 °C og ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

TILLÆG 5

BEREGNING AF ADSORPTION A (%) OG DESORPTION D (%)

Tidsplanen for proceduren er følgende:



Ved alle beregninger er forudsat, at prøvestoffet er stabilt og ikke adsorberes nævneværdigt til beholderens vægge.

ADSORPTION A (A%)

a) *Den parallelle metode*

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert prøveglas (i) ved hvert tidspunkt (t_i) efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (1)\ (^1)$$

Leddene i denne ligning kan beregnes på følgende måde:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0\ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0\ (\mu g) \qquad (3)$$

hvor:

A_{t_i} = adsorptionsprocent (%) til tiden t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden på det tidspunkt t_i, da analysen udføres (µg)

m_0 = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (µg)

C_0 = initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden (µg cm^{-3})

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = massekoncentration af stof i vandig fase på det tidspunkt t_i da analysen udføres (µg cm^{-3}): denne koncentration bestemmes ved analyse med hensyntagen til blindværdierne

V_0 = initialt rumfang af prøveopløsning i kontakt med jorden (cm^3).

Værdierne af adsorptionsprocenten A_{t_i} eller $C_{aq}^{ads}(t_i)$ afsættes på en kurve mod tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes. Eksempler på sådanne kurver er givet i hhv. fig. 1 og fig. 2.

(1) Ligninger, som gælder både for den direkte og den indirekte metode. Alle de øvrige ligninger gælder kun for den indirekte metode.

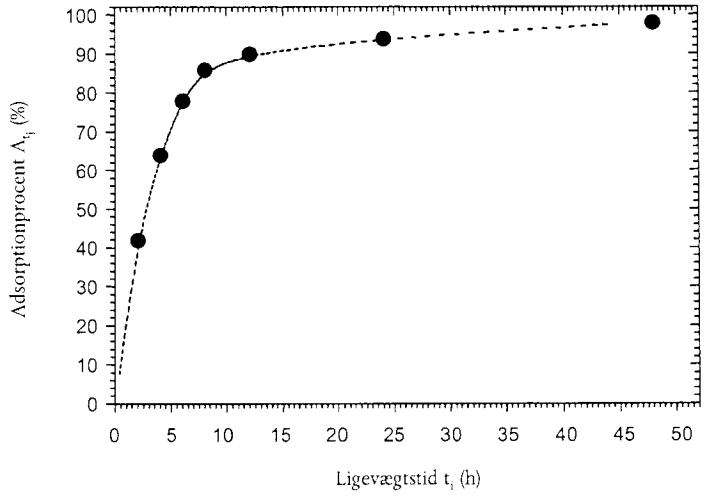


Fig. 1. Adsorptionsligevægtskurve.

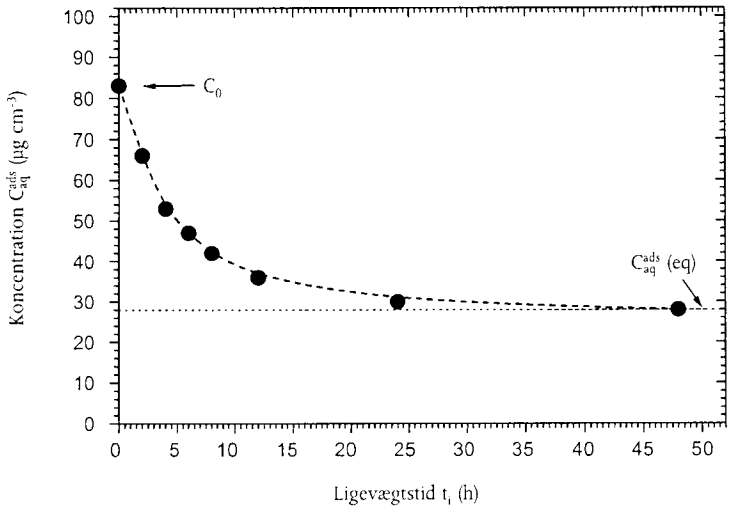


Fig. 2. Massekoncentration af prøvestoffet i vandfasen (C_{aq}) som funktion af tiden.

b) *Den sekventielle metode*

I de følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver af vandig fase til bestemte tidsintervaller.

— Inden for hvert tidsinterval beregnes mængden af stof adsorberet på jorden på følgende måde:

— for det første tidsinterval $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A}\right) \tag{4}$$

— for det andet tidsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A}\right) \tag{5}$$

— for det tredje tidsinterval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Adsorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $A_{\Delta t_i}$, beregnes ved følgende ligning:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)\ (^1)$$

medens adsorptionsprocenten (A_{t_i}) til tidspunktet t_i er givet ved ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)\ (^1)$$

Adsorptionsværdierne A_{t_i} eller $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes som funktion af tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

— Ved ligevægtstidspunktet t_{eq}:

— er massen af prøvestof adsorberet på jorden:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)\ (^1)$$

— er massen af prøvestof i opløsningen:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)\ (^1)$$

— og er adsorptionsprocenten ved ligevægt:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)\ (^1)$$

De ovenfor anvendte parametre er defineret som følger:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden henholdsvis i løbet af tidsintervallerne Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (µg)

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve v_a^A henholdsvis til tiden t_1, t_2, ..., t_n (µg)

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (µg)

v_a^A = rumfang af den prøve, hvori prøvestoffet måles (cm^3)

$A_{\Delta t_i}$ = adsorptionsprocent svarende til et tidsinterval Δt_i (%)

A_{eq} = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt (%).

(1) Ligninger, som gælder både for den direkte og den indirekte metode. Alle de øvrige ligninger gælder kun for den indirekte metode.

DESORPTION D (%)

Tidspunktet t_0 for start af desorptionskinetikforsøget regnes som det tidspunkt, hvor det maksimale opsamlede rumfang af prøvestofopløsningen (efter indtræden af adsorptionsligevægt) erstattes et tilsvarende rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning.

a) *Den parallelle metode*

Til tiden t_i måles massen af prøvestof i den vandige fase udtaget af prøveglas i (V_r^i),og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \qquad (13)$$

Ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{ads}(t_i) = m_{aq}^{ads}(eq)$.

Massen af prøvestof desorberet i et tidsinterval (Δt_i) er givet ved ligningen:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \qquad (14)$$

Desorptionsprocenten beregnes:

— til tidspunktet t_i af ligningen:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

— og i et tidsinterval (Δt_i) af ligningen:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

hvor:

D_{t_i} = desorptionsprocent til tidspunktet t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = desorptionsprocent svarende til et tidsinterval Δt_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof desorberet til tidspunktet t_i (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = masse af prøvestof desorberet af jorden i løbet af et tidsinterval Δt_i (µg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof bestemt analytisk til et tidspunkt t_i i et rumfang opløsning V_r^i, som udtages til analysen (µg)

m_{aq}^{A} = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (µg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (µg)

V_R = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (cm^3)

V_r^i = rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetikforsøget (cm^3).

Værdierne af desorptionen D_{t_i} eller $D_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes mod tiden, og tidsrummet til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

b) *Den sekventielle metode*

I følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver af vandig fase (den sekventielle metode i 14.9. Testens præstationer). Forudsætninger: a) det rumfang supernatant, som er fjernet fra glasset efter adsorptionskinetikforsøget er erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (V_R), og b) det samlede rumfang vandig fase i kontakt med jorden (V_T) under desorptionskinetikforsøget forbliver uændret og er givet ved ligningen:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

Til tidspunktet t_i:

— måles massen af prøvestof i en lille prøve (v_a^D), og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— kan desorptionsprocenten D_{t_i} beregnes af følgende ligning:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

I et tidsinterval (Δt_i):

beregnes mængden af stof desorberet i for hvert tidsinterval på følgende måde:

— for det første tidsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \quad \text{og} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— for det andet tidsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \text{ og}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n+1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ og}$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n+1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \tag{23}$$

Endelig beregnes desorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $D_{\Delta t_i}$ ved hjælp af følgende ligning:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (24)$$

medens desorptionsprocenten D_{t_i} til tidspunktet t_i er givet ved ligningen:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (25)$$

hvor de ovenfor anvendte parametre er defineret således:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden henholdsvis efter tidsrummet Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$, ..., $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof desorberet henholdsvis i løbet af tidsintervallet Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n (µg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$, ..., $m_m^{des}(t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve v_a^D henholdsvis til tidspunktet t_1, t_2, ..., t_n (µg)

V_T = samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode (cm^3)

m_{aq}^A = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (µg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = rumfang supernatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (cm^3)

v_a^D = rumfang af prøve udtaget af prøveglas (i) til analyseformål i desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

TILLÆG 6

ADSORPTION-DESORPTION I JORD: DATARAPPORTERINGSBLADE

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysemetodens egnethed

Afvejet jord	g	
Jord: tør masse	g	
Rumfang $CaCl_2$-opløsning	cm^3	
Nominel koncentreret endelig opløsning	$\mu g\ cm^{-3}$	
Analytisk bestemt koncentreret endelig opløsning	$\mu g\ cm^{-3}$	

Princip i anvendt analysemetode:

Kalibrering af analysemetode:

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Anvendt analysemetodik: Indirekte ☐ Parallel ☐ Sekventiel ☐

Direkte ☐

Adsorptionstest: udtagne prøver

	Symbol	Enhed	Ekvilibreringstid		Ekvilibreringstid		Ekvilibreringstid		Ekvilibreringstid	
Prøveglas nr.										
Afvejet jord	—	g								
Jord: tør masse	m_{soil}	g								
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	cm^3								
Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord		cm^3								
Rumfang stamopløsning		cm^3								
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord	V_0	cm^3								
Begyndelseskoncentration af prøveopløsning	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Masse af prøvestof ved testens begyndelse	m_0	µg								
Efter omrøring og centrifugering										
Indirekte metode										
Parallelle metode										
Koncentration af prøvestof i vandig fase inklusive korrektion for blindværdi	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Sekventielle metode										
Målt masse af prøvestof i prøve V_a^A	$m_{aq}^{ads}(t_i)$	µg								
Direkte metode										
Masse af prøvestof adsorberet på jord	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Beregning af adsorption										
Adsorption	A_t	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Gennemsnitsværdier										
Adsorptionskoefficient	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Gennemsnitsværdier										
Adsorptionskoefficient	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Gennemsnitsværdier										

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionstest: blindprøver og kontrolprøver

	Symbol	Enhed	Blindprøve		Blindprøve		Kontrolprøve	
Glas nr.								
Afvejet jord		g					0	0
Mængde vand i afvejet jord (beregnet)		cm^3					—	—
Tilsat rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning		cm^3						
Tilsat rumfang stamopløsning af prøvestof		cm^3	0	0				
Samlet rumfang vandig fase (beregnet)		cm^3					—	—
Begyndelseskoncentration af prøvestof i vandig fase		$\mu g\ cm^{-3}$						
Efter omrøring og centrifugering								
Koncentration i vandig fase		$\mu g\ cm^{-3}$						

Bemærkning: Tilføj flere kolonner om nødvendigt.

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Massebalance

	Symbol	Enhed				
Prøveglas nr.						
Afvejet jord	—	g				
Jord: tør masse	m_{soil}	g				
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	ml				
Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord		ml				
Rumfang stamopløsning		cm^3				
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord	V_0	cm^3				
Begyndelseskoncentration af prøveopløsning	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$				
Ekvilibreringstid	—	h				
Efter omrøring og centrifugering						
Koncentration af prøvestof i vandig fase ved adsorptionsligevægt inklusive blindværdikorrektion	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$				
Ekvilibreringstid	t_{eq}	h				
1. fortynding med opløsningsmiddel						
Fjernet rumfang vandig fase	V_{rec}	cm^3				
Tilsat rumfang opløsningsmiddel	ΔV	cm^3				
1. ekstraktion med opløsningsmiddel						
Signalstof i opløsningsmiddel	S_{E1}	var.				
Koncentreret prøvestof i opløsningsmiddel	C_{E1}	$\mu g\ cm^{-3}$				
Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge	m_{E1}	µg				
2. fortynding med opløsningsmiddel						
Fjernet rumfang opløsningsmiddel	ΔV_s	cm^3				
Tilsat rumfang opløsningsmiddel	$\Delta V'$	cm^3				
2. ekstraktion med opløsningsmiddel						
Signalstof i opløsningsmiddelfase	S_{E2}	var.				
Koncentreret prøvestof i opløsningsmiddel	C_{E2}	$\mu g\ cm^{-3}$				
Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge	m_{E2}	µg				
Samlet masse prøvestof ekstraheret i to trin	m_E	µg				
Massebalance	MB	%				

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionsisotermer

	Symbol	Enhed								
Prøveglas nr.										
Afvejet jord	—	g								
Jord: tør masse	E	g								
Rumfang vand i afvejet jord (beregnet)	V_{WS}	cm^3								
Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord		cm^3								
Tilsat rumfang stamopløsning		cm^3								
Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jorden (beregnet)	V_0	cm^3								
Koncentration, opløsning	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Ekvilibreringstid	—	h								

Efter omrøring og centrifugering

Stofkoncentration, vandig fase, inklusive blindkorrektion	C_{aq}^{ads} (eq)	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatur		°C								
Adsorptionsmasse pr. enhed jord	C_s^{ads} (eq)	$\mu g\ g^{-1}$								

Regressionsanalyse:

størrelse af K_F^{ads}:

størrelse af 1/n:

regressionskoefficient r^2:

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Anvendt analysemetodik: Indirekte ☐ Parallel ☐ Sekventiel ☐

Desorptionstest

		Symbol	Enhed	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval	Tidsinterval
Prøveglas nr. fra adsorptionstrin							
Masse af stof adsorberet til jord ved adsorptions-ligevægt		m_s^{ads} (eq)	µg				
Fjernet rumfang vandig fase, erstattet med 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Samlet rumfang vandig fase i berøring med jorden	PM SM	V_0 V_T	cm^3 cm^3				
Masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning		m_{aq}^A	µg				

Desorptionskinetik

Målt masse stof desorberet fra jorden til tiden t_i		m_m^{des} (t_i)	µg				
Rumfang opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof	PM	V_r^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
Masse stof desorberet fra jorden til tiden t_i (beregnet)		m_{aq}^{des} (t_i)	µg				
Masse stof desorberet fra jorden i tidsintervallet Δt_i (beregnet)		m_{aq}^{des} (Δt_i)	µg				

Desorptionsprocent

Desorption til tiden t_i	D_{t_i}	%				
Desorption til tidsintervallet Δt_i	$D_{\Delta t}$	%				
Tilsyneladende desorptionskoefficient	K_{des}					

PM: Parallelle metode.

SM: Sekventielle metode.

C.19. BESTEMMELSE AF ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN (K_{OC}) I JORD OG I KLOAKSLAM MED HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG121 (2000).

1.1. INDLEDNING

Stoffers sorptionsegenskaber i jord og kloakslam kan beskrives ved parametre, som bestemmes eksperimentelt med prøvemetode C.18. En vigtig parameter er adsorptionskoefficienten, der defineres som forholdet mellem stoffets koncentration i jord/slam og stoffets koncentration i den vandige fase ved adsorptionsligevægt. Adsorptionskoefficienten normaliseret efter jordens organiske kulstofindhold, K_{oc} er nyttig som indikator for et kemisk stofs bindingsevne til organisk materiale i jord og kloakslam og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Denne parameter kan bestemmes ved korrelering med vandopløseligheden og fordelingskoefficienten i n-oktanol/vand (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

I den her beskrevne forsøgsmetode anvendes HPLC til bestemmelse af adsorptionskoefficienten K_{oc} i jord og i kloakslam (8). De derved beregnede værdier er mere pålidelige end dem, der bygger på QSAR-beregninger (9). Som beregningsmetode kan den ikke helt erstatte batch-ligevægtsforsøgene i prøvemetode C.18. Den beregnede K_{oc} -værdi kan imidlertid være nyttig ved valg af passende testparametre til adsorptions-/desorptionsundersøgelser med prøvemetode C.18 gennem beregning af K_d (fordelingskoefficient) eller K_f (Freundlich adsorptionskoefficient) efter ligning 3 (jf. afsnit 1.2).

1.2. DEFINITIONER

K_d: Fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne C af et opløst prøvestof i et tofasesystem bestående af et sorptionsmiddel (jord eller kloakslam) og en vandig fase; den er dimensionsløs, når koncentrationerne i begge faser udtrykkes på w/w basis. Angives koncentrationen i den vandige fase på vægt/volumen basis, bliver enheden ml · g^{-1}. K_d kan variere med absorptionsmidlets egenskaber og kan være koncentrationsafhængig.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ eller } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

hvor:

C_{soil} = ligevægtskoncentration af prøvestof i jord (µg · g^{-1})

C_{sludge} = ligevægtskoncentration af prøvestof i slam (µg · g^{-1})

C_{aq} = ligevægtskoncentration af prøvestof i vandig fase (µg · g^{-1}, µg · ml^{-1}).

K_f: Freundlich adsorptionskoefficienten defineres som prøvestoffets koncentration i jord eller kloakslam (x/m) når ligevægtskoncentrationen C_{aq} den vandige fase er lig én; enheden er µg · g^{-1} adsorptionsmiddel. Størrelsen kan afhænge af adsorptionsmidlets egenskaber.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \qquad (2)$$

hvor:

x/m = mængde prøvestof x (µg) adsorberet på en mængde adsorptionsmiddel m (g) ved ligevægt

1/n = Freundlich adsorptionsisotermens hældning

C_{aq} = ligevægtskoncentration af prøvestof i vandig fase (µg · ml^{-1})

Ved C_{aq} = 1; $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc}: Fordelingskoefficient (K_d) eller Freundlich adsorptionskoefficient (K_f) normaliseret efter adsorptionsmidlets organiske kulstofindhold (f_{oc}) denne er navnlig for uioniserede kemiske stoffer en vigtig indikator for størrelsen af adsorptionen mellem et stof og adsorptionsmidlet og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Alt efter dimensionen af K_d og K_f kan K_{oc} være dimensionsløs eller have enheden ml · g^{-1} eller µg · g^{-1} organisk stof.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (dimensionsløs eller ml} \cdot g^{-1}) \text{ eller } \frac{K_f}{f_{oc}} (\mu g \cdot g^{-1}) \qquad (3)$$

Forholdet mellem K_{oc} og K_d er ikke altid lineært, således kan K_{oc}-værdierne variere fra jordtype til jordtype, dog med langt mindre variabilitet end K_d eller K_f.

Adsorptionskoefficienten (K_{oc}) afledes af kapacitetsfaktoren (k') ved hjælp af en kalibreringskurve over log k' som funktion af $\log_{oc}$ for de valgte referencestoffer.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad (4)$$

hvor:

t_R: HPLC-retentionstiden for prøve- og referencestof (minutter)

t_0: HPLC-dødtid (minutter) (se afsnit 1.8.2).

P_{OW}: Oktanol-vand fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem koncentrationerne af opløst stof i n-oktanol og vand; den er dimensionsløs.

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \qquad (5)$$

1.3. REFERENCESTOFFER

Før metoden anvendes, bør man kende strukturformel, renhed og eventuel dissociationskonstant. Det er nyttigt at kende opløselighed i vand og organiske opløsningsmidler, oktanol-vand fordelingskoefficient og hydrolyseegenskaber.

For at korrelere de målte HPLC-retentionsdata for et prøvestof med dets adsorptionskoefficient K_{oc}, må der opstilles en kalibreringskurve over log K_{oc} som funktion af log k'. Der kræves mindst seks referencepunkter, heraf mindst ét over og ét under den forventede værdi for prøvestoffet. Metodens nøjagtighed kan forbedres væsentligt ved at anvende referencestoffer, som er strukturmæssigt beslægtet med prøvestoffet. Foreligger sådanne data ikke, er det op til brugeren at vælge passende kalibreringsstoffer. I så fald bør der vælges et mere generelt sæt strukturmæssigt forskelligartede stoffer. De stoffer og K_{oc}-værdier, som kan anvendes, er i tillægget angivet i tabel 1 for kloakslam og tabel 3 for jord. Valg af andre kalibreringsstoffer bør begrundes.

1.4. PRØVEMETODENS PRINCIP

Der udføres HPLC på analysekolonner pakket med en gængs cyanopropyl-faststoffase med både lipofile og polære grupper. Der anvendes en moderat polær stationær fase baseret på silicamatrix:

– O – Si	– CH_2 – CH_2 – CH_2	– CN
silica	ikke polært fyldstof	polær gruppe

Prøvemetodens princip svarer til prøvemetode A.8 (fordelingskoefficient, HPLC-metode). Når prøvestoffet føres gennem kolonnen sammen med den mobile fase, reagerer prøvestoffet med den stationære fase. Prøvestoffets fordeling mellem mobil og stationær fase bevirker, at det bliver forsinket. Den stationære fases dobbelte sammensætning med både polære og upolære bindingssteder giver mulighed for interaktion med de polære og ikke-polære grupper i et molekyle på samme måde som det er tilfældet for et organisk stof i en grundsubstans af jord eller kloakslam. Derved er det muligt at fastlægge forholdet mellem retentionstiden på søjlen og adsorptionskoefficienten på organisk materiale.

pH har væsentlig indflydelse på sorptionsegenskaberne, navnlig af polære stoffer. I landbrugsjord og i tanke i spildevandsbehandlingsanlæg ligger pH normalt mellem 5,5 og 7,5. For ioniserbare stoffer bør der udføres to forsøg med både den ioniserede og den ikke-ioniserede form i passende bufferopløsninger, dog kun når mindst 10 % af prøvestoffet er dissocieret ved pH mellem 5,5 og 7,5

Da vurderingen alene bygger på forholdet mellem retentionen på HPLC-kolonnen og adsorptionskoefficienten, er en kvantitativ analysemetode unødvendig, og kun retentionstiden behøver bestemmes. Hvis man råder over et egnet sæt referencestoffer og kan anvende standardiserede forsøgsbetingelser, er dette en hurtig og effektiv metode til at få et skøn over adsorptionskoefficienten K_{oc}.

1.5. PRØVENS ANVENDELIGHED

HPLC-metoden kan anvendes på kemiske stoffer (mærkede eller umærkede), til hvilke der findes et egnet detektionssystem (f.eks. spektrofotometer, strålingsdetektor), og som er tilstrækkeligt stabile inden for forsøgsvarigheden. Den kan især være nyttig for kemiske stoffer, som er vanskelige at undersøge i andre eksperimentelle systemer (f.eks. stoffer, som er flygtige, eller hvis vandopløselighed er for ringe til at give målelige koncentrationer, og stoffer med høj affinitet til inkuberingssystemernes overflade). Metoden er anvendelig til blandinger, som giver dårligt adskilte elueringsbånd. I så fald bør øvre og nedre grænse for log K_{oc}-værdierne af stofferne i testblandingen angives.

Urenheder kan undertiden vanskeliggøre fortolkningen af HPLC-resultater, men er dog af underordnet betydning, når blot prøvestoffet kan identificeres sikkert ad analytisk vej og kan adskilles fra urenhederne.

Metoden er valideret for stofferne i tabel 1 i tillægget og er endvidere anvendt på en række andre kemiske stoffer i følgende grupper:

— aromatiske aminer (fx trifluralin, 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, N-methylanilin, 1-naphthylamin)

— aromatiske carboxylsyreestere (fx benzoesyremethylester, 3,5-dinitrobenzoesyreethylester)

— aromatiske carbonhydrider (fx toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen)

— aryloxyphenoxypropionsyreestere (fx diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl)

— benzimidazol- og imidazol-fungicider (fx carbendazim, fuberidazol, triazoxid)

— carboxylsyreamider (fx 2-chlorbenzamid, N,N-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid)

— chlorerede carbonhydrider (fx endosulfan, DDT, hexachlorbenzen, quintozen, 1,2,3-trichlorbenzen)

— insekticider af typen organiske fosforforbindelser (fx azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos)

— phenoler (fx phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, pentachlorphenol, 2,4,6-trichlorphenol, 1-naphthol)

— derivater af phenylurinstof (fx isoproturon, monolinuron, pencycuron)

— pigmentfarvestoffer (fx Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)

— polyaromatiske carbonhydrider (fx acenaphthen, naphthalen)

— 1,3,5-triazin-herbicider (fx prometryn, propazin, simazin, terbutryn)

— triazolderivater (fx tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoden er ikke anvendelig til stoffer, som reagerer enten med eluenten eller den stationære fase. Den er ligeledes ikke anvendelig til stoffer, som udviser specifik interaktion med uorganiske komponenter (f.eks. kompleksdannelse med lermineraler). Metoden virker ikke nødvendigvis på overfladeaktive stoffer, uorganiske stoffer og middelstærke til stærke organiske syrer og baser. Log K_{oc}-værdier mellem 1,5 og 5,0 kan bestemmes. Til bestemmelse af ioniserbare stoffer må anvendes en bufret mobil fase, men der må tages forholdsregler til undgåelse af udfældning af bufferkomponenter eller prøvestof.

1.6. KVALITETSKRITERIER

1.6.1. **Nøjagtighed**

Normalt kan adsorptionskoefficienten af et prøvestof bestemmes inden for +/– 0,5 logaritmeenhed af den tilsvarende værdi bestemt ved batch-ligevægtsmetoden (se tabel 1 i tillægget). Bedre nøjagtighed kan opnås, hvis de anvendte referencestoffer er strukturelt beslægtet med prøvestoffet.

1.6.2. **Repeterbarhed**

Bestemmelserne skal foretages mindst som dobbeltbestemmelser. Log K_{oc}-værdier baseret på enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed indbyrdes.

1.6.3. **Reproducerbarhed**

De hidtidige erfaringer med anvendelsen af metoden underbygger dens validitet. En undersøgelse af HPLC-metoden på 48 stoffer (hovedsagelig pesticider), for hvilke der forelå pålidelige data vedrørende K_{oc} i jord, resulterede i en korrelationskoefficient på R = 0,95 (10)(11).

Der er gennemført en sammenlignende laboratorieundersøgelse med 11 deltagende laboratorier med henblik på at forbedre og validere metoden (12). Resultaterne er gengivet i tabel 2 i tillægget.

1.7. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.7.1. **Indledende skøn over adsorptionskoefficienten**

Oktanol-vand fordelingskoefficienten P_{ow} (= K_{ow}) og, i nogen udstrækning, vandopløseligheden kan — navnlig for ioniserede stoffer — benyttes som indikatorer for adsorptionsgraden og således bruges til indledende afgrænsning af området. Der er udgivet en række nyttige korrelationer for forskellige grupper af kemiske stoffer (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2. **Apparatur**

Der anvendes en væskekromatograf forsynet med en impulsfri pumpe og en egnet detektor. Det anbefales at bruge en injektionsventil med injektionssløjfe. Der anvendes gængse kemisk bundne cyanopropyl-harpikser på silicabasis (f.eks. Hypersil og Zorbax CN). En forkolonne af samme materiale kan placeres mellem injektionssystem og analysekolonne. Kolonner fra forskellige leverandører kan variere betydeligt i adskillelsesevne. Vejledende skal man opnå følgende kapacitetsfaktorer k': log k' > 0,0 for log K_{oc} = 3,0 og log k' > 0,4 for log K_{oc} = 2,0 ved anvendelse af en mobil fase bestående af methanol/vand 55/45 %.

1.7.3. **Mobile faser**

Der er afprøvet forskellige mobile faser, og følgende to anbefales:

— methanol/vand (55/45 % v/v)

— methanol/0,01M citratbuffer pH 6.0 (55/45 % v/v).

Til fremstilling af elueringsvæsken anvendes methanol af HPLC-kvalitet og destilleret vand eller citratbuffer. Blandingen afgasses før brug. Elueringen skal være isokratisk (dvs. af ensartet styrke). Er methanol/vand-blandinger ikke egnede, kan andre blandinger af organiske opløsningsmidler og vand anvendes, f.eks. ethanol/vand eller acetonitril/vand. For ioniserbare stoffer anbefales, at pH stabiliseres med bufferopløsning. Der må træffes foranstaltninger til at undgå saltudfældning og tæring af kolonnen, som kan forekomme ved visse blandinger af organisk fase og buffer.

Der må ikke anvendes additiver som f.eks. ionparreagenser, da de kan påvirke sorptionsegenskaberne af den stationære fase. Sådanne ændringer af den stationære fase kan være irreversible. Af denne grund er det ubetinget nødvendigt, at eventuelle forsøg med additiver udføres på separate kolonner.

1.7.4. **Opløste stoffer**

Prøve- og referencestoffer opløses i den mobile fase.

1.8. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.8.1. **Prøvningsbetingelser**

Temperaturen bør registreres under af målingerne. Det anbefalesstærkt, at kolonnerummet er temperaturreguleret for at sikre konstante betingelser under kalibrerings- og overslagsforsøg og måling af prøvestoffet.

1.8.2. **Bestemmelse af dødtid t_0**

Til bestemmelse af dødtiden t_0 kan anvendes to forskellige metoder (se også afsnit 1.2).

1.8.2.1. *Bestemmelse af dødtiden t_0 ved hjælp af en homolog serie*

Denne fremgangsmåde har vist sig give pålidelige og ensartede t_0-værdier. Nærmere enkeltheder herom kan findes i prøvemetode A.8: Fordelingskoefficient (n-oktanol/vand), HPLC-metode.

1.8.2.2. *Bestemmelse af dødtid t_0 ved hjælp af inaktive stoffer, som ikke tilbageholdes af kolonnen*

Teknikken bygger på, at der indsprøjtes en opløsning af formamid, urinstof eller natriumnitrat. Bestemmelserne skal udføres mindst som dobbeltbestemmelser.

1.8.3. **Bestemmelse af retentionstider t_R**

Referencestoffer vælges som beskrevet i afsnit 1.3. Til bestemmelse af disse stoffers retentionstid kan de indsprøjtes som en blandet standard, forudsat at det er godtgjort, at retentionstiden for den enkelte referencestandard er upåvirket af tilstedeværelsen af de andre referencestandarder. Kalibrering skal ske med regelmæssige intervaller mindst to gange dagligt for at tage højde for eventuelle uventede ændringer i kolonnens præstationer. Det bedste er at udføre kalibreringsindsprøjtningerne før og efter indsprøjtning af prøvestoffet for at bekræfte, at retentionstiderne er uændrede. Prøvestofferne indsprøjtes separat i mindst mulig mængde (undgå overbelastning af kolonnen), og deres retentionstider bestemmes.

For at gøre målingerne mere pålidelige bør de udføres mindst som dobbeltbestemmelser. Log K_{oc}-værdier afledt af enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed fra hinanden.

1.8.4. **Bedømmelse**

Kapacitetsfaktorerne k' beregnes af dødtiden t_0 og retentionstiderne t_R for de valgte referencestoffer efter ligning 4 (se afsnit 1.2). Log k'-værdierne for referencestofferne afbildes dereftermod de tilhørende log K_{oc}-værdier fra batchligevægtsforsøgene, som er givet i tabel 1 og 3 i tillægget. Ved hjælp af denne kurve anvendes log k'-værdien for et prøvestof derefter til beregning af dets K_{oc}-værdi. Viser de faktiske resultater, at log K_{oc} for prøvestoffet er uden for kalibreringsområdet, bør forsøget gentages med et andet, mere velegnet referencestof.

2. DATA OG RAPPORTERING

Rapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— identitet og renhed af prøve- og referencestof, samt pK_a-værdi hvis relevant

— beskrivelse af apparatur og forsøgsbetingelser, fx type og dimension af analysekolonne (og forkolonne), detektionsmåde, mobil fase (forholdet mellem komponenterne, samt pH), temperaturområde under målingerne

— dødtiden og metoden anvendt til bestemmelse heraf

— mængde prøve- og referencestof, som indføres i kolonnen

— retentionstiderne for de referencestoffer, der anvendes til kalibrering

— enkeltheder vedrørende den tilnærmede regressionslinje (log k′ mod log K_{oc}) og grafisk fremstilling af regressionslinjen

— gennemsnitlig retention og beregnet d log K_{oc}-værdi for prøvestoffet;

— kromatogrammer.

3. HENVISNINGER

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

TILLÆG

TABEL 1

Sammenligning af K_{oc}-værdier for jordarter og kloakslam, samt værdier beregnet ved HPLC-screeningsmetoden [1] [2]

Stof	CAS-nr.	Log K_{oc} kloakslam	Log K_{oc} ved HPLC	Δ	Log K_{oc} for jordtyper	Log K_{oc} ved HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phenanthren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoesyrephenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroanilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

[1] W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
[2] W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

TABEL 2

Resultater af det laboratoriesammenlignende forsøg (11 deltagende laboratorier), som er gennemført med henblik på at forbedre og validere HPLC-metoden [1]

Stof	CAS-nr.	Log K_{oc} (OECD 106)	K_{oc}	Log K_{oc}
			(HPLC metode)	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

[1] W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

TABEL 3

Anbefalede referencestoffer til HPLC-screeningsmetoden baseret på jordadsorptionsdata

Referencestof	CAS-nr.	Gennemsnitlige log K_{oc}-værdier fra batchligevægt	Nummer på K_{oc}-data	Log S.D.	Kilde
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Phenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N,N-dimethylbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Methylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Methylbenzoat	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naphthalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Trichlorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Phenanthren	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5	4,89	4	4,46	[a]
	12270-13-2				
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.
[c] Data stillet til rådighed af industrien.

C.20. DAPHNIA MAGNA FORMERINGS-TEST

1. METODE

Denne testmetode, der undersøger kemikaliers toksiske indflydelse på formeringsevnen, svarer til OECD TG 211 (1998).

1.1. INTRODUKTION

Det primære mål for testen er at vurdere kemikaliers indvirkning på Dafphnia magnas formeringsevne.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Forældregenerationen er de hundafnier, som er til stede ved testens begyndelse, og hvis formeringsevne er genstand for undersøgelsen.

Afkom er de dafnier, der er født af forældregenerationen under testen.

Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) er den laveste kemikalie-koncentration, der i testen har vist sig at resultere i en statistisk signifikant indflydelse ($p < 0,05$) på formeringen og dødelighed for forældregenerationen inden for den fastlagte eksponeringstid, sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Hvis ikke disse to krav opfyldes, skal der gøres fuldstændigt rede for fastlæggelsen af LOEC (og dermed NOEC).

Koncentration uden observeret effekt (NOEC) er den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en fastlagt eksponeringstid.

EC_x er den koncentration af test-kemikaliet opløst i vand, som resulterer i en x procent reduktion i formeringen af Daphnia magna inden for en fastlagt eksponeringstid.

Den sande formeringshastighed er det mål for vækst, der integrerer formering og den aldersbetingede dødelighed (20)(21)(22). I en »steady state« population vil den være lig nul. For populationer i vækst vil den være positiv, og for populationer, der mindskes, vil den være negativ. Det er klart, at den sidste situation er uholdbar og vil ende med udslettelse af populationen.

Den påviselige grænseværdi er den laveste koncentration, der ses at have effekt, men som ikke kan kvantiteres.

Den målelige grænseværdi er den laveste koncentration, der kan kvantiteres.

Mortalitet et dyr anses for værende dødt, når det ikke kan bevæge sig, dvs. når det ikke er i stand til at svømme, eller hvis der ikke ses bevægelser af vedhæng eller postabdomen inden for 15 sekunder efter forsigtig omrystning af undersøgelsesbeholderen. (Hvis en anden definition anvendes, skal det meddeles sammen med dets reference.)

1.3. PRINCIPPET FOR TESTMETODEN

Unge hundafnier (forældregenerationen), yngre end 24 timer ved testens begyndelse, udsættes for test-kemikaliet opløst i vand i en række koncentrationer. Testens varighed er 21 dage. Ved testens afslutning vurderes det totale antal efterkommere efter den stadig levende forældregeneration. Det betyder, at afkom af dafnier, der er døde i løbet af testen, ikke inkluderes i beregningerne. Forældregenerationens formeringsevne kan udtrykkes på andre måder (fx antal levende efterkommere pr moderdyr fra den første dag, afkom blev observeret), men skal rapporteres sammen med det totale antal afkom frembragt pr. levende moderdyr ved testens afslutning. Formeringsevnen for de dyr, der blev eksponeret for test-kemikaliet, sammenlignes med formeringsevnen i kontrollen/kontrollerne for at fastlægge den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og dermed koncentrationen uden observeret effekt (NOEC). Så vidt gørligt skal data desuden analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at vurdere de koncentrationer, der ville forårsage en x % reduktion i formeringsevnen (dvs. EC_{50}, EC_{20} eller EC_{10}).

Forældregenerationens overlevelse og tiden indtil den første yngel skal også meddeles. Andre effekter af kemikaliet på parametre såsom vækst (dvs. længde) og eventuelt den sande formeringshastighed kan tænkes undersøgt.

1.4. INFORMATION OM TEST-KEMIKALIET

Resultatet fra en akut toksicitets-test (se metode C.2, del I) udført med Daphnia magna bør være tilgængelig. Resultatet kan være nyttigt for valget af en passende række af test-koncentrationer i formeringstestene. Opløseligheden i vand og test-kemikaliets damptryk bør være kendt ligesom en pålidelig analytisk metode til kvantitering af kemikaliet i test-opløsningerne med angivelse af effektivitet med hensyn til genfinding og den målelige grænseværdi.

Data for test-kemikaliet, som kan være nyttige for at fastslå test-betingelserne, inkluderer strukturformel, stoffets renhed, lysstabilitet, stabilitet i test-forløbet, pKa, P_{ow} og resultater af test for spontan nedbrydning (se metode C.4)

1.5. TESTENS VALIDITET

Hvis en test skal være valid skal følgende resultat-krav opfyldes af kontrollen/kontrollerne:

— forældregenerationens mortalitet (hundafnier) må ikke overstige 20 % ved afslutning af testen

— det gennemsnitlige antal levende afkom pr overlevende forældre-hundafnie ved testens afslutning er ≥ 60.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Bægerglas og andet apparatur, der kommer i kontakt med test-opløsningerne, skal være fremstillet af rent glas eller andet kemisk inert materiale. Karrene til undersøgelsen vil almindeligvis være af glas.

Yderligere nødvendigt apparatur kan være følgende:

— iltmålingsapparatur (med mikroelektrode eller andet passende udstyr til måling af ilt i små volumina)

— fyldestgørende apparatur til temperaturkontrol

— pH-meter

— apparatur til måling af vands hårdhedsgrad

— apparatur til måling af totalkoncentrationen af organisk kulstof (TOC) i vand eller apparatur til bestemmelse af det kemiske iltbehov (COD)

— fyldestgørende apparatur til kontrol af lys-regime og måling af lys-intensitet.

1.6.2. **Test-organisme**

Den art, der skal benyttes i testen, er Daphnia magna Straus. Andre arter af dafnier kan anvendes, under forudsætning af at de på passende måde opfylder validitets-kriterierne. (Det relevante validitets-kriterium for dafniearten er formeringsevnen, som den ses i kontrollerne). Hvis der anvendes andre dafniearter, skal de klart defineres og brugen af dem begrundes.

En genotypebestemmelse som identifikation af arten vil være at foretrække. Undersøgelser (1) har vist, at formeringsevnen af Klon A (som stammer fra IRCHA i Frankrig) (3) er stabil med hensyn til det relevante validitets-kriterium med sit gennemsnit på ≥ 60 stk. afkom pr. forældre-dafnie, der overlever ved de dyrkningsbetingelser, som nærværende metode beskriver. Andre kloner er imidlertid acceptable, hvis det kan påvises, at dafnie-kulturen opfylder validitets-kriterierne for en test.

Ved testens begyndelse skal dyrene være yngre end 24 timer og må ikke være først udrugede afkom. De skal være efterkommere af en sund population (dvs. uden tegn på stress, såsom høj mortalitet, tilstedeværelse af handyr og ephippier, forsinkelse i fremkomst af første udrugede afkom, misfarvning osv.) De dyr, der siden skal levere forsøgsdyr, skal dyrkes under betingelser (lys, temperatur, medium, fodring og antal dyr pr. volumenenhed), der svarer til dem, der anvendes i testen. Hvis dafnierne rutinemæssigt lever i et andet medium end det, der anvendes i testen, er det god praksis at inkludere en prætest-akklimatiseringsperiode på normalt tre uger (dvs. en generation) for at undgå at stresse forældregenerationen.

1.6.3. Test-medie

Det anbefales at anvende et veldefineret medium i denne test. Derved undgås brugen af additiver (fx tang, udtræk af jord), som er vanskeligt at karakterisere, men derimod at forbedre muligheden for standardisering laboratorierne imellem. Elendt M4 (4) og M7 media (se tillæg 1) er fundet velegnede til dette formål. Andre medier kan imidlertid også bruges (fx (5)(6)), forudsat at dafnie-kulturen opfylder testens validitets-kriterier.

Hvis der anvendes medier, der indeholder udefinerede tilsætningsstoffer, skal disse klart specificeres, og der skal fremskaffes oplysninger til test-rapporten om sammensætning, særlig med hensyn til kulstofindholdet, da det kan optræde som tilskud til diæten. Det anbefales at fastlægge det totale organiske kulstof- (TOC) og/eller kemiske iltkrav (COD) til det organiske additiv i stamopløsningen, og at der foretages en vurdering af det medfølgende tilskud til TOC/COD i test-mediet. Det anbefales, at niveauet af TOC i mediet (før tilsætning af alger) er under 2 mg/l (7).

Det er vigtigt at gøre sig klart i forbindelse med undersøgelse af kemikalier, der indeholder metaller, at test-mediets egenskaber (fx hårdhed, cheleringskapacitet) kan have indflydelse på test-kemikaliets toksicitet. Af den grund er et fuldtud defineret medium ønskværdigt. For tiden er de eneste fuldtud definerede medier, som er egnede til langtidskulturer med Daphnia, magna Elendt M4 og M7. Begge indeholder EDTA som cheleringsmiddel. Work har påvist (2), at cadmiums tilsyneladende toksicitet generelt er lavere, når formerings-testen udføres med M4 og M7 end med medier uden EDTA. Af den grund er M4 og M7 ikke at anbefale, når der skal undersøges kemikalier indeholdende metaller, ligesom andre medier kendt for at have chelerende stoffer ligeledes bør undgås. Til kemikalier, der indeholder metaller, tilrådes brugen af andre medier som fx hårdt ferskvand tilsat ASTM (7), som ikke indeholder EDTA, hvortil sættes ekstrakt af tang (8). Denne kombination af hårdt ferskvand tilsat ASTM med ekstrakt af tang er også velegnet til langtidskulturer og undersøgelse af Daphnia magna (2), endskønt den udøver en let chelerende effekt på grund af den organiske komponent i den tilsatte tangekstrakt.

Under hele testen bør koncentrationen af opløst ilt være over 3 mg/l. pH bør være inden for 6-9 og normalt ikke variere mere end 1,5 enheder. Hårdhed over 140 mg/l (målt som $CaCO_3$) anbefales. Test på dette niveau og derover har vist formeringsevne i overensstemmelse med validitets-kriterierne (9)(10).

1.6.4. Test-opløsninger

Test-opløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger bør almindeligvis fremstilles ved opløsning af de relevante kemikalier i test-mediet.

Brugen af organiske opløsningsmidler eller dispergenser er i nogle tilfælde nødvendige til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning, men alle anstrengelser bør tages i anvendelse for at undgå brugen af sådanne materialer. Eksempler på passende opløsningsmidler er acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylene glycol. Eksempler på dispergenser er Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Under alle omstændigheder bør test-kemikaliet i test-opløsningen ikke overskride graden af opløselighed i test-mediet.

Opløsningsmidler anvendes til fremstilling af en stamopløsning, som kan doseres i vand med stor nøjagtighed. Med den anbefalede koncentration af opløsningsmiddel i det endelige test-medium (dvs. 0,1 ml/l) vil de ovenfor nævnte opløsningsmidler ikke være toksiske, og de vil heller ikke øge et kemikaliums vandopløselighed.

Dispergensernes funktion er at hjælpe til med en nøjagtig dosering og dispersion. Med den anbefalede koncentration af dispergens i det endelige test-medium (dvs. 0,1 ml/l) vil de ovenfor nævnte dispergenser ikke være toksiske, og de vil heller ikke øge et kemikaliums vandopløselighed.

1.7. TESTENS DESIGN

Tilsætning til måleglassene og de påfølgende håndteringer af dem bør foretages på en randomiseret måde. Hvis dette ikke gøres, risikerer man bias, som kunne opfattes som resultatet af forskellige koncentrationer. Helt specielt kan dette ses, hvis undersøgelsesrækker håndteres systematisk efter behandling eller koncentrationer, at tidsrelaterede resultater, som fx person-træthed eller anden fejlmulighed, kan medføre større effekt ved de højere koncentrationer. Yderligere, hvis test-resultaterne kan tænkes påvirkede af begivenheder ved testens start eller af omgivelserne, som fx karrenes placering i laboratoriet, bør man overveje at dele testen op i grupper.

1.8. FREMGANGSMÅDE

1.8.1. **Omstændigheder ved ekspositionen**

1.8.1.1. *Varighed*

Testen varer 21 dage.

1.8.1.2. *Påfyldning*

Moderdyrene holdes individuelt med ét dyr pr måleglas med 50-100 ml medium i hvert måleglas.

Af hensyn til målinger af koncentrationen af test-kemikaliet kan større volumina være nødvendige; det er dog tilladt at foretage den kemiske analyse på en pulje sammensat fra flergangsbestemmelser. Hvis der anvendes volumina større end 100 ml, kan det være nødvendigt at øge fødemængden for at sikre tilstrækkelig fødetilgang for dafnien og overensstemmelse med validitets-kriterierne. Hvis der anvendes gennemstrømnings-test, kan det af tekniske grunde være nødvendigt med alternative design (fx fire grupper med 10 dyr i et større test-volumen), men enhver ændring i test-design skal meddeles.

1.8.1.3. *Antal dyr*

Ved semi-statiske test skal der være mindst 10 dyr, hver holdt separat, for hver test-koncentration og mindst 10 dyr, hver holdt separat, i kontrolserien.

Det har ved gennemstrømnings-test vist sig passende med 40 dyr opdelt i grupper med 10 dyr for hver test-koncentration (1). Man kan anvende et mindre antal test-organismer, og der anbefales da et minimum på 20 dyr pr. koncentration opdelt i dobbelt- eller flergangsbestemmelser med et tilsvarende antal dyr (fx fire bestemmelser med hver fem dafnier). Det bemærkes, at ved test, hvor dyrene holdes gruppevis, vil det ikke være muligt at udtrykke formeringsevnen som det totale antal levende efterkommere frembragt for hvert levende forældredyr, dersom forældredyr, dør i løbet af forsøget. I de tilfælde bør man udtrykke formeringsevnen som det totale antal levende afkom pr. forældredyr, som var i live ved testens begyndelse.

1.8.1.4. *Fodring*

I semi-statiske forsøg bør fordring foretages daglig eller i hvert fald tre gange ugentlig (dvs. i sammenhæng med udskiftning af medium). Afvigelser fra dette (fx for gennemstrømnings-test) skal meddeles.

Under forsøget bør diæten for forældredyr fortrinsvis være levende algeceller af en eller flere af følgende: Chlorella sp., Selenastrum capricornutum (nu Pseudokirchneriella subcapitata (11)) og Scenedesmus subspicatus. Den tilførte diæt skal baseres på mængden af organisk kulstof (C) for hvert forældredyr. Undersøgelser (12) har vist, at for Daphnia magna er det tilstrækkeligt med fodermængder af størrelsesordenen 0,1 til 0,2 mg C/Daphnia/døgn med henblik på det ifølge validitets-kriterierne ønskede antal afkom. Fodermængden kan enten være konstant gennem hele forsøgsperioden eller, om det ønskes, kan der gives en lavere mængde til at begynde med og siden lade mængden forøges for at tage hensyn til forældredyrets vækst under forløbet. I sidstnævnte tilfælde bør fodermængden i hele perioden stadig være inden for de anbefalede mængder på 0,1 til 0,2 mg C/Daphnia/døgn.

Måling af kulstofindhold er tidsrøvende, men hvis erstatningsmålinger, som fx celletal af alger eller lysabsorption, anvendes for nemheds skyld for at afmåle den korrekte fødemængde, må hvert laboratorium fremstille et nomogram, som sammenholder erstatningsmålingen med kulstofindholdet i algekulturen (se tillæg 2 for rådgivning om konstruktion af nomogram). Nomogrammer skal kontrolleres mindst en gang årligt og hyppigere, hvis betingelserne for algerne er ændrede. Det er vist, at lysabsorption er en bedre erstatning end celletælling til beregning af kulstofindhold (13).

Man bør tilføre dafnierne algesuspensionen i koncentreret form, således at mindst muligt af alge-kulturmediet overføres til forsøgskarret. Opkoncentrering af alger kan foretages ved centrifugering efterfulgt af resuspension i destilleret vand eller deioniseret vand eller dafniekulturmedium.

1.8.1.5. *Lys*

16 timers lys med en intensitet, der ikke overstiger 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatur*

Test-mediets temperatur skal ligge mellem 18 og 22 °C. I det enkelte forsøg bør temperaturen, om muligt, ikke variere mere end 2 °C (fx 18-20, 19-21 eller 20-22 °C). Det kan være på sin plads at anvende et forsøgskar yderligere til brug for temperatur-monitoreringen.

1.8.1.7. *Gennemluftning*

Måleglassene må ikke gennemluftes under forsøget.

1.8.2. **Test-koncentrationer**

Normalt bør der være mindst fem test-koncentrationer arrangeret i en geometrisk række med en adskillelsesfaktor, som helst ikke bør overstige 3,2, og der skal udføres det passende antal af flergangsbestemmelser for hver test-koncentration (se sektion 1.8.1.3). Begrundelse skal angives, hvis færre end fem koncentrationer undersøges. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger opløseligheden i test-mediet.

Når range for koncentrationerne skal fastlægges, bør følgende tages i betragtning:

i) Hvis formålet er at opnå LOEC/NOEC, skal den laveste test-koncentration være så lav, at frugtbarheden ved denne koncentration ikke adskiller sig signifikant fra kontrollens. Hvis det ikke er tilfældet, skal testen gentages med formindsket laveste koncentration.

ii) Hvis formålet er at opnå LOEC/NOEC, bør den højeste test-koncentration være så høj, at frugtbarheden ved denne koncentration er signifikant lavere end i kontrollen. Hvis det ikke er tilfældet, skal testen gentages med forøget højeste koncentration.

iii) Hvis EC_x for indvirkning på formeringsevnen beregnes, er det tilrådeligt, at der anvendes tilstrækkeligt mange koncentrationer til, at EC_x kan defineres med passende sikkerhed. Hvis EC_{50} for indvirkning på formeringsevnen beregnes, er det tilrådeligt, at den højeste test-koncentration er større end den ved EC_{50}. Ellers vil sikkerhedsgrænserne for EC_{50} blive meget vide, og selvom man kan beregne EC_{50}, er det ikke muligt i tilstrækkelig grad at vurdere, om forsøget har været fyldestgørende.

iv) Range for test-koncentrationerne bør ikke inkludere koncentrationer, der har en statistisk signifikant indflydelse på forældredyrets overlevelse, da det vil ændre undersøgelsens natur fra en simpel formerings-test til en kombineret formerings- og overlevelses-test, som stiller krav om mere komplekse statistiske analyser.

Kendskab på forhånd til test-kemikaliets toksicitet (fx fra en hurtig test og/eller fra undersøgelser over range) kan hjælpe til at finde passende test-koncentrationer.

Når et opløsningsmiddel eller et dispergens er anvendt i præparationen af test-opløsningen (se sektion 1.6.4), bør slutkoncentrationen i måleglasset ikke være større end 0,1 ml/l og desuden være den samme i alle måleglassene.

1.8.3. **Kontroller**

Sideløbende med test-serien bør udføres en test-mediumkontrol og ligeledes, hvis det er relevant, en kontrolserie, som indeholder opløsningsmiddel eller dispergens i koncentrationer som dem, der anvendes i forsøget. Der skal udføres et passende antal flergangsbestemmelser (se sektion 1.8.1.3).

Almindeligvis vil variationskoefficienten for det gennemsnitlige antal afkom pr forældredyr i kontrollen/kontrollerne i en vellykket test være ≤ 25, og dette skal meddeles fra test-design, hvor dyrene har været holdt alene.

1.8.4. **Fornyelse af medium**

Hyppigheden for fornyelse af mediet afhænger af test-kemikaliets stabilitet, men fornyelse bør foretages mindst tre gange om ugen. Hvis man ved fra forudgående stabilitetsundersøgelser, at test-kemikaliet ikke er stabilt (dvs. uden for range 80-120 % af den nominelle koncentration eller falder under de 80 % af den målte begyndelseskoncentration) og ændrer sig i løbet af den maksimale fornyelsesperiode (dvs. tre døgn), bør man overveje at skifte mediet hyppigere eller at gå over til en gennemstrømnings-test.

Når mediet skal fornyes i semi-statiske test, er der fremstillet en anden række af måleglas, og forældredyret flyttes over til dem fx ved hjælp af en glaspipette med en passende diameter. Mindst muligt medium bør overflyttes sammen med dafnien.

1.8.5. Observationer

Resultatet af undersøgelser gjort under forsøget skal noteres på data-ark (se eksempler i tillæg 3 og 4). Hvis der ønskes andre målinger (se 1.3 og 1.8.8), kan det være nødvendigt med andre undersøgelser.

1.8.6. Afkom

Det er bedst dagligt at fjerne og tælle afkom fra hvert forældredyr fra første dag, der ses yngel, for at hindre ynglen i at indtage den føde, der var tiltænkt forældredyret. Undersøgelsens formål kræver kun, at man tæller antal levende afkom, men tilstedeværelsen af aborterede æg eller dødt afkom bør også noteres.

1.8.7. Mortalitet

Dødelighed blandt forældredyrene bør noteres dagligt og i hvert fald samtidigt med, at afkommet tælles.

1.8.8. Andre parametre

Selvom metoden principielt er designet til at vurdere virkning på formeringsevnen, er det muligt, at andre virkninger kan kvantiteres, så der kan fortages statistiske beregninger. Målinger af vækst er særdeles ønskværdige, eftersom de giver informationer om mulige subletale virkninger, som kan tænkes at være mere nyttige end måling alene af formeringsevnen; det anbefales, at man ved forsøgets afslutning måler længden af forældredyrene (dvs. kropslængden minus den anale spina). Andre parametre kan måles eller beregnes såsom tiden til fremkomst af den første yngel (og den påfølgende yngel), antal og størrelse af yngel pr. dyr, antallet af aborteret yngel, tilstedeværelse af handyr eller ephippier, populationens egentlige formeringshastighed.

1.8.9. Hyppighed af analyser og målinger

Ilt-koncentration, temperatur, hårdhedsgrad og pH-værdier bør måles i hvert fald hver uge i nye og gamle medier, i kontroller og i opløsninger med den højeste koncentration af test-kemikaliet.

Mens forsøget løber, måles koncentrationen af test-kemikaliet med regelmæssige intervaller.

I semi-statiske test, hvor koncentrationen af test-kemikaliet forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration (dvs. inden for range 80-120 % — se 1.4 og 1.8.4), anbefales det som et minimum at måle højeste og laveste test-koncentration ved fremstillingen og i forbindelse med udskiftning ved en lejlighed i den første uge af forsøget (dvs. analyser skal udføres på en prøve fra samme opløsning — frisk fremstillet og ved en fornyelse). Disse målinger bør gentages mindst ugentligt derefter.

I forbindelse med test, hvor test-kemikaliet ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle test-koncentrationer, når de er frisk fremstillede og ved udskiftning. I de test, imidlertid, hvor test-kemikaliets målte begyndelseskoncentration ikke ligger inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, men hvor der er tilstrækkelig bevis for, at begyndelsesværdierne kan genfindes og er stabile (dvs. inden for range 80-120 % af begyndelseskoncentrationen), kan kemiske målinger reduceres i uge 2 og 3 til kun at omfatte den højeste og den laveste test-koncentration. I alle tilfælde behøver man før fornyelse kun at bestemme test-kemikaliets koncentration i et af måleglassene i en flergangsbestemmelse for hver af test-koncentrationerne.

Anvendes en gennemstrømnings-test, er et analyse-regime svarende til de semi-statiske test passende (men i dette tilfælde er måling på »gamle« opløsninger ikke mulig). I den første uge kan det være tilrådeligt at øge antallet af prøvetagninger (fx tre hold målinger) for at sikre, at test-koncentrationerne holder sig stabile. I den type test bør gennemstrømningshastigheden for fortyndingsvæske og test-kemikalium kontrolleres daglig.

Hvis det viser sig, at koncentrationen af det undersøgte kemikalium på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration gennem hele testforløbet, kan resultaterne baseres på de nominelle eller målte begyndelseskoncentrationer. Hvis afvigelsen fra den nominelle eller målte begyndelseskoncentration er større end ± 20 %, skal resultaterne udtrykkes som tidsvægtet gennemsnit (se tillæg 5).

2. DATA OG RAPPORTERING

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Formålet med denne test er at bestemme virkningen af test-kemikaliet på det totale antal levende afkom pr. forældredyr, som er i live ved forsøgets afslutning. Det totale antal afkom pr. forældredyr skal beregnes for hver beholder (dvs. hver enkeltbestemmelse). Viser det sig ved en enkeltbestemmelse, at forældredyret dør under forsøget, eller at det er af hankøn, ekskluderes denne enkeltbestemmelse fra analysen. Analysen vil så blive baseret på et reduceret antal enkeltbestemmelser.

Vurderingen af LOEC og dermed NOEC for virkningen af kemikaliet på det totale antal afkom forudsætter en beregning af det gennemsnitlige antal afkom på tværs af enkeltbestemmelserne for hver koncentration samt den samlede residuale standarddeviation. Dette kan gøres ved hjælp af en variansanalyse (ANOVA). Gennemsnittet for hver koncentration skal så sammenholdes med kontrolgennemsnittet ved hjælp af en passende metode til multiple sammenligninger. Dunnetts eller Williams' test kan være anvendelige (14) (15) (16) (17). Det er nødvendigt at kontrollere, at ANOVA-forudsætningen om varians-homogenitet holder stik. Det anbefales, at dette gøres grafisk snarere end ved en formel signifikanstest (18). Et passende alternativ er Bartletts test. Hvis den nævnte forudsætning ikke holder, bør man overveje at transformere data med henblik på sikring af homogenitet før udførelse af ANOVA eller at udføre en vægtet ANOVA. Størrelsen af den virkning, der kan påvises med ANOVA (dvs. mindste signifikante forskel), skal beregnes og meddeles.

Til vurdering af den koncentration, som medfører en 50 % reduktion af det totale antal afkom (dvs. EC_{50}), konstrueres en passende kurve, fx en logistisk kurve, som er tilpasset data ved hjælp af en statistisk metode, fx de mindste kvadraters metode. Kurven skal parameteriseres, således at EC_{50} og standardfejlen på denne kan aflæses direkte. Dette vil lette beregningen af sikkerhedsgrænserne for EC_{50}. Medmindre der er gode grunde til at foretrække andre sikkerhedsgrænser, skal tosidede 95 % sikkerhedsgrænser meddeles. Tilpasningsproceduren skal helst tillade en vurdering af signifikansen af den manglende overensstemmelse. Man kan gøre dette grafisk, eller man kan inddele den residuale kvadratsum i to komponenter: manglende overensstemmelse og tilfældig variation, hvorefter man udfører en signifikanstest for den manglende overensstemmelse. Eftersom behandlinger, der medfører højere frugtbarhed, må formodes at udvise større varians i antallet af afkom end behandlinger, der medfører lav frugtbarhed, bør man overveje at vægte de observerede data, så de afspejler de forskellige varianser i de forskellige behandlingsgrupper (se baggrundsinformation i reference (18)).

Ved analysen af data fra den endelige »ring test« (2) tilpassedes en logistisk kurve ved hjælp af følgende model, selvom andre passende modeller kan anvendes:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

hvor:

Y: totale antal afkom pr. forældredyr, som var i live ved forsøgets afslutning (beregnet for hver beholder)

x: substanskoncentrationen

c: det forventede antal afkom, når x = 0

x_0: EC_{50} i populationen

b: hældningen.

Denne model vil formentlig være passende i et stort antal tilfælde, men der vil være forsøg, hvor den ikke er adækvat. Man bør vurdere modellens validitet som foreslået ovenfor. I nogle tilfælde vil det være passende at anvende en hormese-model, hvor lave koncentrationer giver en øget virkning (19).

Andre virkningskoncentrationer, såsom EC_{10} eller EC_{20} kan også estimeres, men det kan i så fald være formålstjenligt at anvende en parameterisering af modellen, som er forskellig fra den, der anvendtes til at estimere EC_{50}.

2.2. TESTRAPPORT

Test-rapporten skal indeholde:

2.2.1. **For test-kemikaliet:**

— fysiske natur og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— data vedrørende den kemiske identifikation inklusive renhedsgrad.

2.2.2. **For dyrearten:**

— klonen (om den er blevet genotypebestemt), leverandør eller kilde (hvis kendt) og dyrkningsbetingelserne. Hvis en anden art end Daphnia magna anvendes, skal det meddeles og begrundes.

2.2.3. **Test-omstændigheder:**

— den anvendte test-procedure (fx semistatisk eller gennemstrømning, volumen, antal dafnier pr liter ved påfyldning

— lysperiode og lysintensitet

— test-design (fx antal flergangsbestemmelser, antal forældredyr pr måleglas)

— detaljer vedrørende kulturmediet

— eventuel tilsætning af organisk materiale, inkluderende sammensætning, kilde, fremstillingsmetode, stamopløsningens TOC/COD, vurdering af resulterende TOC/COD i testmediet

— detaljeret information angående fodring, inklusive mængde (i mg C/Dafnia/døgn) og liste (fx fodertype(r)) inklusive algernes specifikke navn (arten) og, hvis kendt, herkomst og dyrkningsbetingelserne

— måde til fremstilling af stamopløsninger og hyppighed af fornyelse (evt. opløsningsmidler eller dispergenser og deres koncentrationer skal opgives).

2.2.4. **Resultater**

— resultater af ethvert forudgående studium af test-kemikaliets stabilitet

— de nominelle test-koncentrationer og resultaterne af alle analyser til bestemmelse af koncentrationen af test-kemikaliet i måleglasset (se eksempler på data-ark i tillæg 4); metodens genfindingsevne og dens grænser skal også meddeles

— vandets kvalitet i måleglasset (dvs. pH, temperatur, koncentrationen af opløst ilt og TOC og/eller COD og hårdhedsgrad, hvor dette er relevant) (se eksempler på data-ark i tillæg 3)

— fuld fortegnelse over levende afkom efter hvert moderdyr (se eksempler på data-ark i tillæg 3)

— antal døde moderdyr og dagen for hændelsen (se eksempler på data-ark i tillæg 3)

— variationskoefficienten for frugtbarhed i kontrollerne (baseret på det totale antal afkom pr forældredyr, som er i live ved testens afslutning)

— det totale antal af levende afkom pr. forældredyr (for hver af flergangsbestemmelserne), som er i live ved testens afslutning plottet over for koncentrationen af test-kemikaliet

— laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) med hensyn til frugtbarhed, inklusive en beskrivelse af den anvendte statistiske fremgangsmåde og en angivelse af, hvilken virkningsstørrelse der kunne måles og koncentration uden observeret effekt (NOEC) med hensyn til frugtbarhed; hvor relevant opgives ligeledes LOEC/ NOEC-mortaliteten for forældredyrene

— hvor relevant EC_x med hensyn til frugtbarhed og sikkerhedsgrænser og en graf af den model, der var anvendt til beregningen, hældningen på dosis-responskurven og standardfejlen

— andre observerede biologiske virkninger eller målinger: der skal rapporteres enhver biologisk virkning, som blev observeret eller målt (fx forældredyrenes vækst) inklusive relevante begrundelser

— forklaringer for enhver afvigelse fra test-metoden.

3. REFERENCER

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C., Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma. 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 532.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, pp. 1156-1166.

TILLÆG 1

KOMPLET FREMSTILLING AF MEDIERNE M7 OG M4

Akklimatisering til Medierne Elendt M7 og M4

Nogle laboratorier har haft problemer med at overflytte dafnier direkte til M4- (1) og M7-medierne. Imidlertid har en gradvis akklimatisering givet nogen succes; man flytter dafnierne fra deres eget medium til et 30 % Elendt, siden til et 60 % Elendt og så til et 100 % Elendt. Akklimatiseringsperioden kan være på op til en måned.

FREMSTILLING

Sporelementer

Separate stamopløsninger (I) med de forskellige sporstoffer fremstilles primært i vand af passende renhedsgrad, fx deioniseret, destilleret vand eller vand renset ved omvendt osmose. Ud fra disse forskellige stamopløsninger (I) fremstilles en sekundær stamopløsning (II), som indeholder alle sporstofferne (kombinationsopløsningen), som følger:

Stamopløsning I (enkelt stof)	Antal mg sat til 1 liter vand	Koncentrationer (refererende til M4) (fold)	For at fremstille stamopløsning II tilsættes nedennævnte antal ml af stamopløsning I til 1 liter vand	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2 * 4 H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2 * 6 H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 * 2 H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 * 6 H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
$Na_2EDTA * 2 H_2O$	5 000	2 000	–	–
$FeSO_4 * 7 H_2O$	1 991	2 000	–	–

Na_2EDTA- og $FeSO_4$-opløsningerne fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks. Dette giver:

21 Fe-EDTA-opløsning	1 000	20,0	5,0

M4- og M7-medierne

M4- og M7-medierne fremstilles ved hjælp af stamopløsning II, makro-næringsstofferne og vitaminerne som følger:

	Antal mg sat til 1 liter vand	Koncentrationer (relateret til medium M4) (fold)	Antal ml af stamopløsning, der sættes til 1 liter for at fremstille mediet	
			M4	M7
Stamopløsning II samlede sporstoffer		20	50	50
Stamopløsning med makro-næringsstoffer (enkelte stoffer)				
$CaCl_2 * 2 H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 * 7 H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 * 9 H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombineret vitaminopløsning	–	10 000	0,1	0,1
Den kombinerede vitaminopløsning fremstilles ved at sætte de 3 vitaminer til 1 liter vand som vist nedenfor:				
Thiamine hydrochlorid	750	10 000	–	–
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000	–	–
Biotine	7,5	10 000	–	–

Den kombinerede vitaminopløsning opbevares i små mængder i frossen tilstand. Vitaminerne sættes til mediet kort før brugen.

NB: For at undgå udfældning af salte, når det fuldstændige medium fremstilles, skal man tilsætte de enkelte opløsninger til 500-800 ml deioniseret vand og derefter fylde op til 1 liter.

Den første publicerede beskrivelse af M4-mediet kan findes i Elendt, B.P. (1990) Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

TILLÆG 2

ANALYSE FOR DET TOTALE ORGANISKE KULSTOF (TOC) OG FREMSTILLING AF NOMOGRAM TIL TOC-INDHOLDET I ALGEFODERET

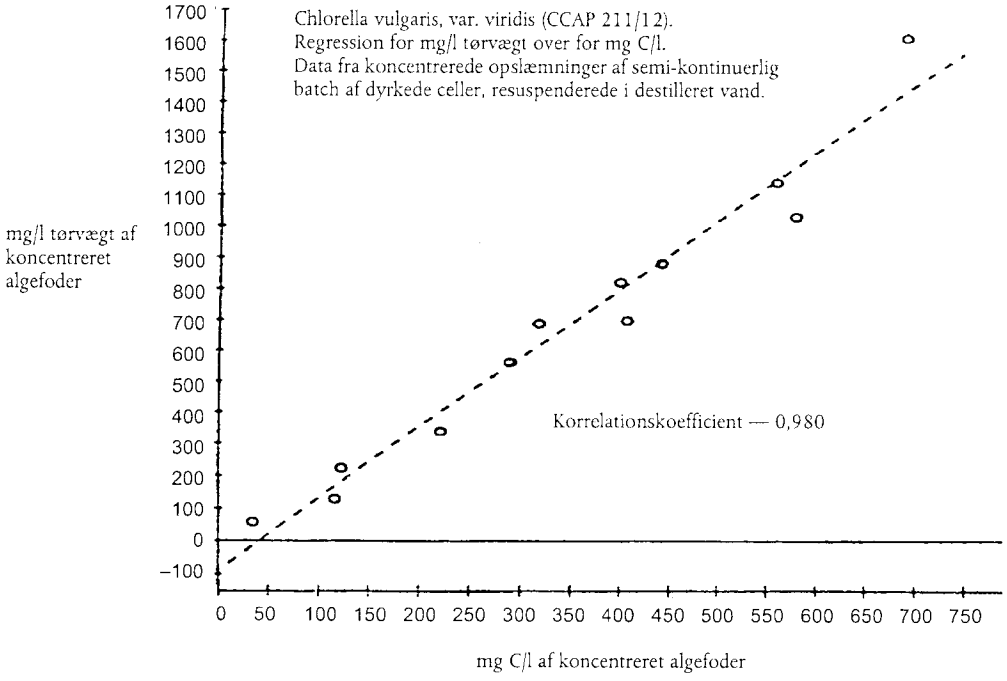
Det erkendes, at kulstofindholdet i algefoderet almindeligvis ikke vil blive målt direkte, men ud fra korrelationer (dvs. nomogrammer med erstatningsmålinger, såsom antallet af alge-celler eller lysabsorbans).

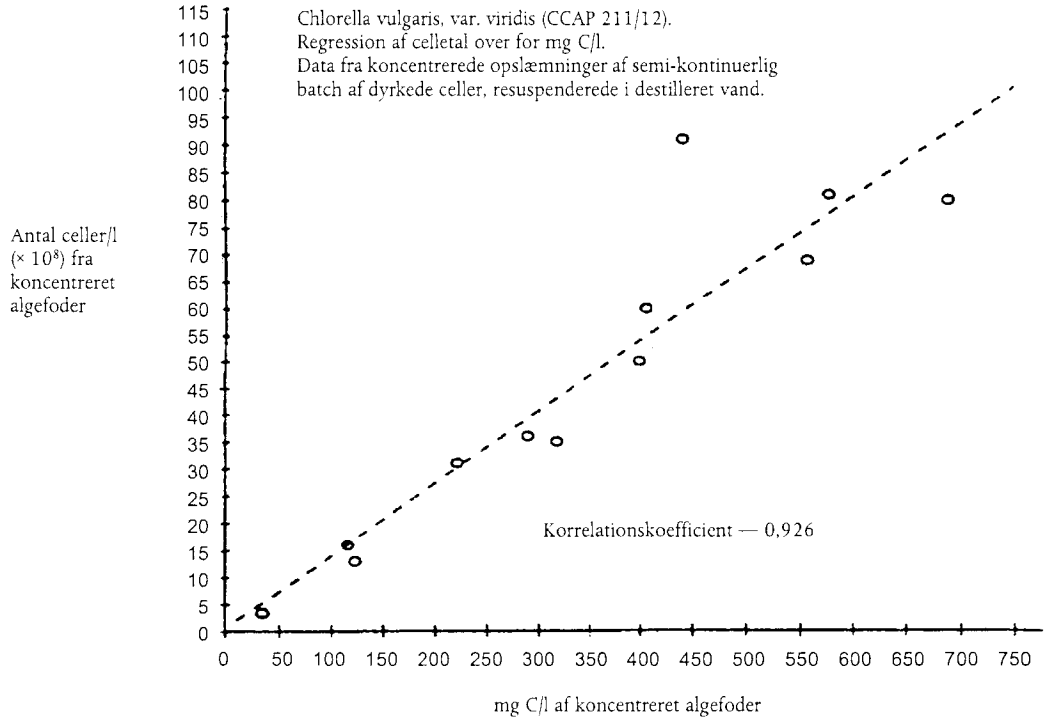
TOC bør måles ved oksidation ved høje temperaturer snarere end ved UV eller persulphate metoder. (Se: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

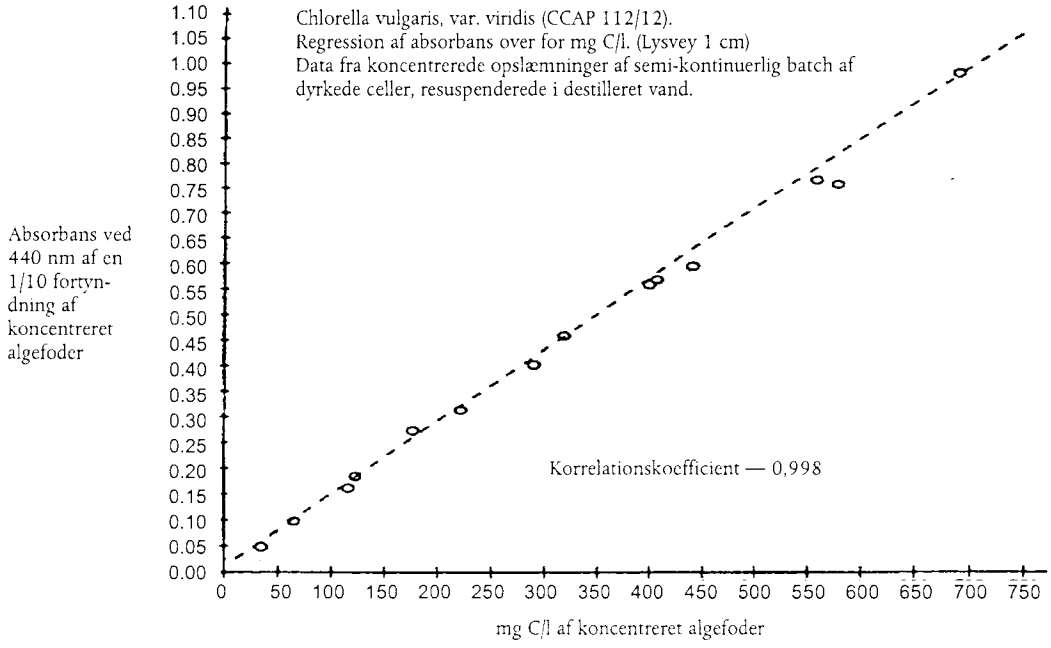
Med henblik på fremstilling af nomogrammer skal algerne adskilles fra dyrkningsmediet ved centrifugering med påfølgende resuspension i destilleret vand. Mål erstatningsparameteren og TOC-koncentrationen i hver prøve som en tredobbelt bestemmelse. Blindværdier måles i destilleret vand, og TOC-koncentrationen trækkes fra TOC-værdien i algeprøven.

Nomogrammet skal være lineært i hele området over kulkoncentrationer. Eksempler ses nedenfor:

NB: Værdierne fra det her viste nomogram må ikke anvendes; det er essentielt at laboratorierne selv fremstiller deres egne nomogrammer.




Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 211/12).
Regression af celletal over for mg C/l.
Data fra koncentrerede opslæmninger af semi-kontinuerlig batch af dyrkede celler, resuspenderede i destilleret vand.
Antal celler/l (× 10⁸) fra koncentreret algefoder
Korrelationskoefficient — 0,926
mg C/l af koncentreret algefoder


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Regression af absorbans over for mg C/l. (Lysvey 1 cm)
Data fra koncentrerede opslæmninger af semi-kontinuerlig batch af dyrkede celler, resuspenderede i destilleret vand.
Absorbans ved 440 nm af en 1/10 fortynding af koncentreret algefoder
Korrelationskoefficient — 0,998
mg C/l af koncentreret algefoder

TILLÆG 3

EKSEMPEL PÅ DATA-ARK TIL NOTATER OM FORNYELSE AF MEDIUM, FYSISK/KEMISK MONITORERING, FODRING, FORMERING OG MORTALITET BLANDT VOKSNE DAFNIER

Eksperiment nr.: Startdato: Klon: Medium: Fodertype: Test-kemikalium: Nominel koncentration:

Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Fornyelse af medium (sæt kryds)																								
pH (1)																							ny	
																							gammel	
O_2 i mg/l (1)																							ny	
																							gammel	
Temperatur (°C) (1)																							ny	
																							gammel	
Fodring (sæt kryds)																								
Antal levende afkom (2)																								Total
Måleglas 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Kumulativ voksen-mortalitet (3)																								

(1) Angiv hvilket glas, der blev anvendt til undersøgelsen.
(2) Anfør aborteret afkom som »AB« i den relevante boks.
(3) Anfør mortalitet for ethvert voksent dyr som »M« i den relevante boks.

TILLÆG 4

EKSEMPEL PÅ DATA-ARK MED RESULTATER AF KEMISKE ANALYSER

a) **Målte koncentrationer**

Nominel koncentration	Prøver i uge 1		Prøver i uge 2		Prøver i uge 3	
	ny	gammel	ny	gammel	ny	gammel

b) **Målte koncentrationer i procent af nominelle**

Nominel koncentration	Prøver i uge 1		Prøver i uge 2		Prøver i uge 3	
	ny	gammel	ny	gammel	ny	gammel

TILLÆG 5

BEREGNING AF TIDSVÆGTET GENNEMSNIT

Tidsvægtet gennemsnit

Idet koncentrationen af test-kemikaliet kan falde i perioden mellem fornyelsen af medierne, er det nødvendigt at overveje, hvilken koncentration der skal vælges som repræsentant for variationen af koncentrationer, som den voksne dafnie bliver udsat for. Valget skal baseres på såvel biologiske som statistiske betragtninger. Hvis for eksempel formeringen formodes mest påvirket af den højeste koncentration, så skal den anvendes. Hvis imidlertid den akkumulerede effekt eller langtidseffekten fra det toksiske stof regnes for mere vigtigt, så er gennemsnitskoncentrationen mere relevant. I dette tilfælde er den tidsvægtede gennemsnitskoncentration det passende at anvende, eftersom den tager hensyn til variationen af hvert øjebliks koncentration i tidsforløbet.

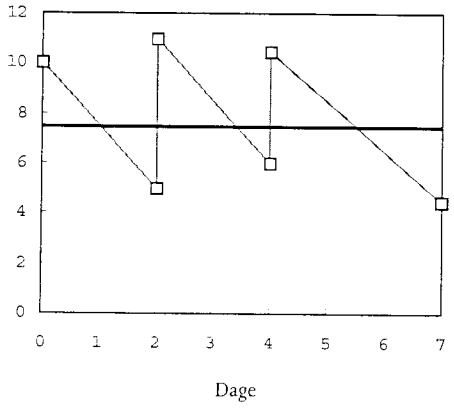


Fig. 1: Eksempel på tidsvægtet gennemsnit

Fig. 1 viser som eksempel et (forenklet) forsøg over syv dage med en fornyelse af mediet på dag 0, 2 og 4.

— Zigzaglinjen repræsenterer koncentrationen på ethvert tidspunkt. Faldet i koncentration formodes at følge en eksponential henfaldsproces.

— De seks angivne punkter repræsenterer de målte koncentrationer ved begyndelsen og slutningen af hver fornyelsesperiode.

— Den tykke, solide linje angiver placeringen af det tidsvægtede gennemsnit.

Det tidsvægtede gennemsnit er beregnet, så arealet under det tidsvægtede gennemsnit har samme størrelse som arealet under koncentrationskurven. Beregningen af det ovenfor viste eksempel ses i tabel 1.

Tabel 1: Beregning af tidsvægtet gennemsnit

Fornyelse nr.	Dage	Konc. 0	Konc. 1	Ln(Konc.0)	Ln(Konc.1)	Areal
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Totale antal dage: 7					Totale areal	50,091
					TW gennemsnit	7,156

»Dage« er antallet af dage i fornyelsesperioden.

»Konc0« er den målte koncentration ved begyndelsen af hver fornyelsesperiode.

»Konc1« er den målte koncentration ved afslutningen af hver fornyelsesperiode.

»Ln(Konc0)« er den naturlige logaritme til Konc.0.

»Ln(Konc1)« er den naturlige logaritme til Konc.1.

»Arealet« er arealet under eksponentialkurven for hver fornyelsesperiode. Det beregnes således:

$$\text{Areal} = \frac{\text{Konc0} - \text{Konc1}}{\text{Ln(Konc0)} - \text{Ln(Konc1)}} \times \text{dage}$$

Det tidsvægtede gennemsnit (TW gennemsnit) er det »totale areal« divideret med de »totale antal dage«.

Tabellen vil selvfølgelig strække sig over 21 dage i forbindelse med dafnie-formeringstesten.

Det er klart, at når der kun foretages målinger ved begyndelsen og slutningen af hver fornyelsesperiode, kan man ikke bekræfte, at henfaldsprocessen er eksponentiel. En anderledes kurve ville resultere i en anderledes beregning for arealet. En eksponential henfaldsproces er dog ikke usandsynlig, og den er den bedste kurve at anvende, når der ikke foreligger andre informationer.

Stor omhu må udvises, hvis en kemisk analyse ikke kan påvise test-kemikaliet ved afslutningen af en fornyelsesperiode. Medmindre man kan påvise, med hvilken hastighed test-kemikaliet forsvandt fra opløsningen, er det ikke muligt at finde frem til et realistisk areal under kurven, hvilket medfører, at det er umuligt at finde frem til et rimeligt tidsvægtet gennemsnit.

DA

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER

Bruxelles, den 29.10.2003
KOM(2003) 644 endelig

2003/0256(COD)
2003/0257(COD)

DEL VI - Bilag XI til XVII til forslaget til forordning (indeholder ændret finansieringsoversigt på s. 247 ff.)

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS FORORDNING

om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (Reach), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og forordning (EF) {om persistente organiske miljøgifte}

Forslag til

EUROPA-PARLAMENTETS OG RÅDETS DIREKTIV

om ændring af Rådets direktiv 67/548/EØF med henblik på tilpasning til Europa-Parlamentet og Rådets forordning (EF) om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier

(forelagt af Kommissionen)

{SEC(2003) 1171}

BILAG XI

ALMINDELIGE BESTEMMELSER OM DOWNSTREAM-BRUGERES VURDERING AF KEMISKE STOFFER OG UDARBEJDELSE AF KEMISKE SIKKERHEDSRAPPORTER

INDLEDNING

Formålet med dette bilag er at fastlægge, hvordan downstream-brugere skal vurdere og dokumentere, at risiciene ved de(t) stof(fer), de anvender, er tilstrækkeligt styret, når det gælder anvendelser, som ikke omfattes af det sikkerhedsdatablad, de har fået overdraget, og at andre brugere længere henne i forsyningskæden er i stand til at styre risiciene på betryggende vis. Vurderingen skal dække stoffets livscyklus fra downstream-brugeren modtager det og anvender det til egne formål og til de formål, der for hans vedkommende er udpeget længere nede i forsyningskæden. Vurderingen skal både omfatte stoffet i sig selv og dets anvendelse i et præparat eller en genstand.

Ved den kemiske sikkerhedsvurdering og ved udarbejdelse af den kemiske sikkerhedsrapport tager downstream-brugeren hensyn til de oplysninger, han har modtaget i sikkerhedsdatabladet fra leverandøren af det kemiske stof i henhold til artikel 29 i forordningen. Når der foreligger en risikovurdering udført i henhold til fællesskabslovgivningen (f.eks. en risikovurdering udført efter forordning 793/93), skal denne, når det er hensigtsmæssigt, tages i betragtning ved udarbejdelse af den kemiske sikkerhedsvurdering, og dette skal fremgå af den kemiske sikkerhedsrapport. Afvigelser fra sådanne vurderinger skal begrundes. Vurderinger foretaget efter andre internationale og nationale programmer kan ligeledes tages i betragtning.

Den proces, som downstream-brugere følger ved den kemiske sikkerhedsvurdering og ved udarbejdelse af den kemiske sikkerhedsrapport, består af tre trin:

Trin 1: Opstilling af eksponeringsscenario (-scenarier)

Downstream-brugeren opstiller eksponeringsscenarier for anvendelser, som ikke er omfattet af et sikkerhedsdatablad, han har fået overdraget i overensstemmelse med punkt 5 i bilag I.

Trin 2: Om nødvendigt, udbygning af leverandørens risikovurdering

Hvis downstream-brugeren anser de vurderinger, der er anført i det til ham udleverede sikkerhedsdatablad, for passende, er yderligere risikovurdering for PBT og vPvB ikke nødvendig. I så fald anvender han til risikovurderingen de relevante oplysninger, der er givet af leverandøren. Dette angives i den kemiske sikkerhedsrapport.

Hvis downstream-brugeren ikke anser de vurderinger, der er anført i det til ham udleverede sikkerhedsdatablad, for passende, foretager han de relevante risikovurderinger i henhold til bilag I, punkt 1-4, alt efter hvad der er passende i hans tilfælde.

Når downstream-brugeren finder, at han til udarbejdelse af den kemiske sikkerhedsrapport har behov for flere oplysninger end de af leverandøren fremlagte, skal downstream-brugeren skaffe sådanne oplysninger. Kan oplysningerne kun fremskaffes ved forsøg i hvirveldyr, forelægger han agenturet forslag til et testprogram i henhold til artikel 35. Han forklarer, hvorfor han anser supplerende oplysninger for nødvendige. Mens resultaterne af yderligere test afventes, registrerer han de risikostyringsforanstaltninger, han har iværksat.

Når de supplerende test er afsluttet, reviderer downstream-brugeren om nødvendigt den kemiske sikkerhedsrapport og sit sikkerhedsdatablad.

Trin 3: Risikokarakterisering

Der foretages risikokarakterisering for hvert nyt eksponeringsscenario som foreskrevet i punkt 6 i bilag I. Risikokarakteriseringen præsenteres under det relevante punkt i den kemiske sikkerhedsrapport og sammenfattes i sikkerhedsdatabladet under de(t) pågældende punkt(er).

I disse trin kan der foretages en trinvis tilpasning mellem på den ene side opstilling af nye eksponeringsscenarier med dertil hørende udarbejdelse og gennemførelse eller anbefaling af risikostyringsforanstaltninger, og på den anden side generering af yderligere oplysninger. Formålet med at generere yderligere oplysninger er at opnå en mere præcis risikokarakterisering gennem en nærmere risikovurdering og/eller eksponeringsvurdering.

Downstream-brugeren udarbejder en kemisk sikkerhedsrapport med redegørelse for sin kemiske sikkerhedsvurdering under anvendelse af del C, punkt 5 og 6, i det i punkt 7 i bilag I viste skema og de øvrige punkter i samme skema, hvis det er hensigtsmæssigt.

Del A i den kemiske sikkerhedsrapport skal indeholde en erklæring om, at downstream-brugeren med henblik på sine egne anvendelser har gennemført de risikostyringsforanstaltninger, der beskrives i de relevante eksponeringsscenarier, og at de risikostyringsforanstaltninger, der er beskrevet i eksponeringsscenarierne for de udpegede anvendelser, er formidlet til brugere længere henne i forsyningskæden.

BILAG XII

KRITERIER FOR IDENTIFIKATION AF PERSISTENTE, BIOAKKUMULERENDE OG GIFTIGE STOFFER SAMT STOFFER, DER ER MEGET PERSISTENTE OG MEGET BIOAKKUMULERENDE

Dette bilag indeholder kriterierne for identifikation af:

i) persistente, bioakkumulerende og giftige stoffer (PBT-stoffer) og

ii) meget persistente og meget bioakkumulerende stoffer (vPvB-stoffer).

Et stof betegnes som et PBT-stof, når det opfylder kriterierne i afsnit 1.1, 1.2 og 1.3. Et stof betegnes som et vPvB-stof, når det opfylder kriterierne i afsnit 2.1 og 2.2. Dette bilag finder ikke anvendelse på uorganiske stoffer, men på organiske metalforbindelser.

1. PBT-STOFFER

Et stof, der opfylder alle tre kriterier nedenfor, er et PBT-stof.

1.1. Persistens

Et stof *opfylder* persistenskriteriet (P-), når:

– halveringstiden i havvand er over 60 dage, eller

– halveringstiden i fersk- eller brakvand er over 40 dage, eller

– halveringstiden i marint sediment er over 180 dage, eller

– halveringstiden i sediment i fersk- eller brakvand er over 120 dage, eller

– halveringstiden i jord er over 120 dage.

Vurderingen af persistens i miljøet skal baseres på foreliggende oplysninger om halveringstiderne under de pågældende betingelser, som beskrives af registranten.

1.2. Bioakkumulering

Et stof *opfylder* bioakkumuleringskriteriet (B-), når:

– biokoncentrationsfaktoren (BCF) er over 2000.

Vurderingen af bioakkumulering skal baseres på målte biokoncentrationsdata i akvatiske arter. Der kan anvendes data fra både ferskvandsarter og marine arter.

1.3. Toksicitet

Et stof *opfylder* toksicitetskriteriet (T-), når:

– langtidskoncentrationen uden observeret effekt (NOEC) for marine organismer og ferskvandsorganismer er under 0,01 mg/l, eller

– stoffet er klassificeret som carcinogent (kategori 1 eller 2), mutagent (kategori 1 eller 2) eller reproduktionstoksisk (kategori 1, 2 eller 3), eller

– der er andre vidnesbyrd om kronisk toksicitet, f.eks. klassificering som T, R48, eller Xn, R48, ifølge direktiv 67/548/EØF.

2. vPvB–STOFFER

Et stof, der opfylder kriterierne nedenfor, er et vPvB-stof.

2.1. Persistens

Et stof *opfylder* kriteriet for stærk persistens (vP-), når:

– halveringstiden i hav-, fersk- eller brakvand er over 60 dage, eller

– halveringstiden i sediment i hav-, fersk- eller brakvand er over 180 dage, eller

– halveringstiden i jord er over 180 dage.

2.2. Bioakkumulering

Et stof *opfylder* kriteriet for stærk bioakkumulering (vB-), når:

– biokoncentrationsfaktoren er over 5000.

BILAG XIII FORTEGNELSE OVER STOFFER, DER KRÆVER GODKENDELSE

.

BILAG XIV
DOSSIER

Formålet med dette bilag er at fastlægge de generelle principper, efter hvilke medlemsstaterne på fællesskabsplan forelægger og begrunder forslag til begrænsninger, harmoniseret klassificering og mærkning eller identifikation af stoffer som et PBT-stof, et vPvB-stof eller et stof, der er tilsvarende problematiske.

DOSSIERETS INDHOLD

Del A – Forslag

Forslaget skal indeholde en beskrivelse af:

a) de(n) foreslåede begrænsning(er), herunder de(t) pågældende stof(fer) og produktion, anvendelse(r) og/eller markedsføring på det pågældende marked, eller

b) de(t) pågældende stof(fer) og den foreslåede harmoniserede klassificering og mærkning, eller

c) de(t) pågældende stof(fer), og hvorvidt de(t) foreslås registreret som PBT-stof i henhold til artikel 54, litra d), som vPvB-stof i henhold til artikel 54, litra e), eller som et stof, der er tilsvarende problematisk i henhold til artikel 54, litra f).

Del B – Teknisk og videnskabeligt grundlag

En fare- eller risikovurdering, som viser, at der kræves handling på fællesskabsplan ud over de foranstaltninger, der allerede er indført. Vurderingen skal udformes i det i del B af den kemiske sikkerhedsrapport i bilag I fastlagte format, og der skal, når det er hensigtsmæssigt, anvendes de i samme bilag fastlagte metoder.

Ved forslag til begrænsninger udfyldes de relevante dele af bilag I, som er nødvendige til underbyggelse af forslaget,

Ved forslag til klassificering og mærkning udfyldes de relevante dele af bilag I, som er nødvendige til underbyggelse af forslaget.

Ved forslag til registrering som PBT-stof eller vPvB-stof udfyldes de relevante dele af punkt 1-4, som er nødvendige til underbyggelse af forslaget.

Medlemsstaterne tager hensyn til alle relevante oplysninger i registreringsdossieret og kan benytte alle foreliggende oplysninger. Der kræves ikke erklæringer om manglende relevante oplysninger.

For oplysninger, som ikke tidligere er forelagt agenturet og som anvendes i dossieret, udarbejdes et fyldigt resumé, som forelægges agenturet i det format, agenturet har fastlagt i henhold til artikel 108.

I dossieret kan der tages hensyn til emissioner af stoffet fra enhver kilde.

I dossieret kan der opstilles eksponeringsscenarier, som tager hensyn til de risikostyringsforanstaltninger, som faktisk er indført.

Dossieret skal indeholde videnskabelig begrundelse for eventuel gruppering af stoffer.

Den medlemsstat, som indsender dossieret, skal på anmodning sende alle oplysninger, som dossieret er baseret på eller henviser til, til agenturet eller Kommissionen.

Del C – Begrundelse for tiltag på fællesskabsplan

a) Dokumentation for, at de gennemførte risikostyringsforanstaltninger (herunder dem, der udpeges i registreringer efter artikel 9-13) ikke er tilstrækkelige.

b) Begrundelse for forslaget om, at der kræves handling på fællesskabsplan.

c) Udpegelse af foreliggende handlingsmuligheder til imødekommelse af betænkeligheder vedrørende punkter i del B. For begrænsninger skal det herunder dokumenteres, at alternative stoffer og/eller processer er taget i betragtning ved udarbejdelse af forslaget.

d) Udpegelse af de administrative, retlige eller andre instrumenter, hvormed de foreliggende handlingsmuligheder kan gennemføres.

e) Begrundelse for den valgte handlingsmulighed og gennemførelsesmetode. Handlingsmulighederne vurderes efter følgende kriterier:

   i) **effektivitet**: handlingerne skal være målrettet mod de virkninger eller eksponeringer, der medfører de påviste risici, og skal inden for et rimeligt tidsrum kunne reducere disse risici til et niveau, hvor risikoen er kontrolleret på betryggende vis

   ii) **gennemførlighed**: handlingerne skal være gennemførlige, skal kunne håndhæves og skal være håndterlige; der skal gives prioritet til foranstaltninger, der kan gennemføres inden for den bestående infrastruktur

   iii) **kontrolmulighed**: muligheden for at overvåge resultatet af gennemførelsen af den foreslåede handling

   iv) der kan foretages en socio-økonomisk vurdering af virkningen af den foreslåede handling for producenter/importører og/eller downstream-brugere samt for andre parter. Denne vurdering skal følge bilag XV.

Del D – Andre oplysninger

a) En erklæring om, hvilke interesserede parter, der er blevet hørt vedrørende den foreslåede handling, og hvordan deres synspunkter er taget i betragtning.

b) Andre relevante oplysninger.

BILAG XV

SOCIO-ØKONOMISK ANALYSE

Dette bilag beskriver de oplysninger, der kan behandles i en socio-økonomisk analyse (SEA), når en sådan indsendes sammen med ansøgningen om godkendelse, som angivet i artikel 59, stk. 5, litra a), eller i forbindelse med en foreslået begrænsning som foreskrevet i artikel 66, stk. 3, litra b).

Agenturet udarbejder en vejledning i udfærdigelse af socio-økonomiske analyser. Socio-økonomiske analyser og bidrag dertil skal forelægges i det format, der fastlægges af agenturet i henhold til artikel 108.

For den socio-økonomiske analyse og bidrag til den gælder, at ansvaret for detaljeringsgrad og område påhviler den, der søger godkendelsen, eller, når der foreslås en begrænsning, den berørte part. De givne oplysninger kan vedrøre de socio-økonomiske virkninger på ethvert plan.

En socio-økonomisk analyse kan omfatte følgende elementer:

– Virkningerne for ansøgeren (ansøgerne) af, at en godkendelse meddeles eller nægtes, og virkningerne for industrien (f.eks. producenter og importører) af en foreslået begrænsning. Forretningsmæssige konsekvenser for alle andre aktører i forsyningskæden, downstream-brugere og tilknyttede virksomheder, således virkningen på investeringer, engangs- og driftsomkostninger (f.eks. efterkommelse, overgangsordninger, ændringer af eksisterende processer, indberetnings- og overvågningssystemer, indførelse af ny teknik mv.).

– Virkninger for forbrugerne af, at en godkendelse meddeles eller nægtes, eller af en foreslået begrænsning. Som eksempel kan nævnes produktpriser, ændringer i produkters sammensætning, kvalitet og præstationer, produkters tilgængelighed og forbrugernes valgmuligheder.

– Sociale virkninger af, at en godkendelse meddeles eller nægtes, eller af en foreslået begrænsning. Som eksempel kan nævnes jobsikkerhed og beskæftigelse.

– Alternativers tilgængelighed, egnethed og tekniske gennemførlighed samt de økonomiske konsekvenser deraf, og oplysninger om tempo og potentiale af den teknologiske udvikling i de(n) pågældende sektor(er). For ansøgninger om godkendelse, de sociale og/eller økonomiske konsekvenser af at anvende eventuelt foreliggende alternativer nævnt i artikel 59, stk. 5, litra b).

– De bredere følgevirkninger for handel, konkurrence og økonomisk udvikling (navnlig for SMV'er) af, at en godkendelse meddeles eller nægtes, eller af en foreslået begrænsning. Heri kan indgå lokale, regionale, nationale og internationale aspekter.

– For en foreslået begrænsning, forslag til myndighedskrav eller andre foranstaltninger, som kan opfylde formålet med den foreslåede begrænsning (idet eksisterende lovgivning tages i betragtning). Heri kan indgå en vurdering af omkostningerne ved alternative risikostyringsforanstaltninger.

– For en foreslået begrænsning, de sociale og økonomiske fordele ved den foreslåede begrænsning. Som eksempel kan nævnes virkninger på arbejdsmiljø og eksternt miljø, og sådanne virkningers fordeling på f.eks. geografiske områder og befolkningsgrupper.

– En socio-økonomisk analyse kan desuden beskæftige sig med ethvert andet spørgsmål, der anses for relevant af de(n) pågældende ansøger(e) eller interesserede part(er).

BILAG XVI

Begrænsninger vedrørende fremstilling, markedsføring og anvendelse af visse farlige stoffer, præparater og artikler

↓ 76/769/EØF (tilpasset)

BILAG ⌦ XVI ⌫

Begrænsninger vedrørende fremstilling, markedsføring og anvendelse af visse farlige stoffer, præparater og artikler

	↓ 76/769/EØF
Betegnelse for stoffet, stofgruppen eller præparatet	**Begrænsninger**
	↓ 85/467/EØF, artikel 1, stk. 1 (nyt) (tilpasset) →1 89/677/EØF, artikel 1, nr. 1
1. – ~~Polychlorerede biphenyler (PCB) med undtagelse af mono- og bichlorerede diphenyler~~ – Polychlorerede triphenyler (PCT) – Præparater, herunder olieaffald, der indeholder mere end →1 0,005 ← vægtprocent ~~PCB eller~~ PCT	⌦ 1. ⌫ Er ikke tilladt ⌦. Dog er følgende anvendelse af de apparater, anlæg og væsker, der var i brug den 30. juni 1986, fortsat tilladt indtil deres bortskaffelse eller i resten af deres levetid ⌫ ~~undtagen i følgende tilfælde på de anførte betingelser~~: ~~1)~~ ⌦ a) ⌫ ~~senest indtil den 30. juni 1986:~~ elektriske apparater i »lukket system«; transformere og modstands- og reaktionsmateriel; ~~2)~~ ⌦ b) ⌫ ~~senest indtil den 30. juni 1986:~~ store kondensatorer (totalvægt~~)~~ ≥ 1 kg); ~~3)~~ ⌦ c) ⌫ ~~senest indtil den 30. juni 1986:~~ små kondensatorer~~; (på betingelse af at PCB'ernes chlorindhold maksimalt er 43 %, og at disse ikke indeholder mere end 3,5 % pentachlorerede diphenyler eller stærkere chlorerede diphenyler)~~; ~~4)~~ ⌦ d) ⌫ ~~senest indtil den 30. juni 1986:~~ varmeførende væsker i lukkede anlæg; ~~5)~~ ⌦ e) ⌫ ~~senest indtil den 30. juni 1986:~~ hydraulikvæsker til underjordisk minemateriel~~;~~ ~~Anvendelse af de under punkt 1 til 5 ovenfor omhandlede apparater, anlæg og væsker, der er i brug den 30. juni 1986, er fortsat tilladt indtil deres bortskaffelse eller til udløbet af deres levetid~~. ⌦ 2. Medlemsstaten ⌫ ~~-~~ ~~Medlemsstaterne~~ kan dog af sundheds- og miljøbeskyttelseshensyn ~~på deres område~~ forbyde anvendelse af ~~disse~~ apparater, anlæg og væsker ⌦, der er omfattet af punkt 1, ⌫ før deres bortskaffelse eller ~~før udløbet af deres levetid~~ ⌦ i resten af deres levetid ⌫. ⌦ 3. ⌫ ~~-~~ Afsætning på brugtmarkedet af ~~disse~~ apparater, anlæg og væsker, ⌦ der er omfattet af punkt 1, og ⌫ som ikke skal bortskaffes, er forbudt ~~efter den~~

~~30 juni 1986~~.

⊠ 4. ⊠ ~~-~~ Såfremt ⊠ medlemsstaten ⊠ ~~medlemsstaterne~~ mener, at det af tekniske grunde ikke er muligt at anvende ~~erstatningsprodukter~~ ⊠ erstatningsartikler ⊠ , kan ⊠ den ⊠ ~~de~~ ~~fortsat~~ tillade anvendelse ~~af PCB~~, af PCT og af præparater heraf, såfremt de, på normale betingelser for vedligeholdelsen af ~~materiellet~~ ⊠ apparaterne ⊠ , udelukkende skal supplere niveauet i væsker, der indeholder ~~PCB~~ ⊠ PCT ⊠ , i eksisterende anlæg, som er i god driftsmæssig stand, og som er købt inden ~~dette direktivs ikrafttræden~~ ⊠ 1. oktober 1985 ⊠ .

~~6)~~ ⊠ 5. ⊠ ~~senest indtil den 30. juni 1986: udgangsmaterialer og mellemprodukter, som skal omdannes til andre produkter, der ikke er omfattet af forbudet i direktiv 76/769/EØF og i de direktiver, der har ændret dette; efter den 30. juni 1986 kan medlemsstaterne~~ ⊠ Medlemsstaten kan ⊠ , såfremt ~~de~~ ⊠ den ⊠ forudgående fremsender begrundet meddelelse herom til Kommissionen, give dispensation fra forbudet mod markedsføring og anvendelse af ~~disse udgangsmaterialer og mellemprodukter~~ ⊠ basis- og mellemstoffer samt basis- og mellemprodukter ⊠ i det omfang, ⊠ den ⊠ ~~de~~ mener, at dette ikke vil få sundheds- og miljøskadelige virkninger.

🡻 85/467/EØF, artikel 1, stk. 2, andet led (nyt) (tilpasset)

⊠ 6. ⊠ Med forbehold af ~~bestemmelserne i~~ ⊠ gennemførelsen af ⊠ andre ~~direktiver~~ ⊠ fællesskabsbestemmelser ⊠ om mærkning af farlige stoffer og præparater ~~kan medlemsstaterne foreskrive~~, ~~at~~ ⊠ skal ⊠ apparater og anlæg, der indeholder ~~PCB og~~ PCT, også ~~skal~~ være forsynet med oplysninger om bortskaffelsen af ~~PCB og~~ PCT samt om vedligeholdelse og brug af apparater og anlæg, der indeholder sådanne stoffer. Oplysningerne skal kunne læses vandret, når den genstand, der indeholder ~~PCB eller~~ PCT, er hensat eller fastgjort på normal måde. Påskriften skal stå i tydelig kontrast til baggrunden~~. Medlemsstaterne kan forlange, at påskriften affattes~~ ⊠ og skal være affattet ⊠ på et sprog, som forstås inden for ⊠ det ⊠ ~~deres~~ område ⊠ , hvor genstanden anvendes ⊠ .

		↓ 76/769/EØF (tilpasset)
2.	1-chlor-æthen (monomeret vinyl-chlorid)~~.~~ ⌦ CAS-nr. 75-01-4 EINECS-nr. 200-831-0 ⌫	Er ikke tilladt som drivmiddel i aerosoler, uanset til hvilke formål.

		↓ 97/64/EF, artikel 1 (tilpasset)
3.	Flydende stoffer og præparater, der anses for farlige i henhold til definitionerne i ~~artikel 2, stk. 2, samt kriterierne i bilag VI, del 2, 3 og 4, til~~ Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer[1] ~~som~~ ⌦ senest ⌫ tilpasset til den tekniske udvikling ved Kommissionens direktiv ~~93/21/EØF~~ ⌦ 2001/59/EF ⌫[2] og ~~96/54/EF~~[3] ⌦ Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 1999/45/EF af 31. maj 1999 om indbyrdes tilnærmelse af medlemsstaternes love og administrative bestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige præparater[4], ændret ved Kommissionens direktiv 2001/60/EF[5] ⌫ .	1. ~~Må ikke anvendes~~ ⌦ Er ikke tilladt ⌫ – i dekorationsgenstande, der frembringer lys- eller farvevirkninger ved forskellige faser, f.eks. i hyggelamper og askebægre – i spøg- og skæmtartikler – i spil til en eller flere deltagere, samt alle genstande bestemt til sådanne formål, selv ud fra dekorative aspekter. 2. Uden at ~~ovenstående bestemmelser~~ ⌦ punkt 1 ⌫ indskrænkes, må stoffer og præparater, – som indebærer fare ved indtagelse og er mærket med R65 – som kan anvendes som brændstof i dekorative lamper, og – som markedsføres i emballage med et rumindhold på 15 liter eller mindre hverken indeholde et farvestof, undtagen hvor dette er nødvendigt af afgiftshensyn, ⌦ og/ ⌫ eller parfume. ⌦ 3. ⌫ ~~Uden at~~ ⌦ Medmindre andet er fastsat i ⌫ andre fællesskabsbestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater ~~derved indskrænkes~~, skal emballagen til de stoffer og

		præparater, der er omfattet af punkt 2 og beregnet til brug i lamper, ~~være læseligt og uudsletteligt mærket med~~ ⌦ bære følgende påskrift, der skal være let læselig og uudslettelig ⌫ : «Hold lamper, som indeholder denne væske, uden for børns rækkevidde».

		↓ 79/663/EØF, artikel 1 (tilpasset)
4.	Triphosphat (2,3-dibromopropyl) CAS-nr. ~~(Chemical Abstract Service Number)~~ 126-72-7	Er ikke tilladt i tekstilvarer, der er bestemt til at komme i berøring med huden, for eksempel beklædningsgenstande, underbeklædningsgenstande og linned.

		↓ 82/806/EØF, artikel 1 (tilpasset)
5.	Benzen CAS-nr. 71-43-2 ~~(Chemical Abstract Service Number)~~ ⌦ EINECS-nr. 200-753-785 ⌫	⌦ 1. ⌫ Er ikke tilladt i legetøj eller dele af legetøj, der markedsføres, når indholdet af benzen i fri form overstiger 5 mg/kg af vægten af legetøjet eller af en del af legetøjet.

	↓ 89/677/EØF, artikel 1, nr. 3 (tilpasset)
	⌦ 2. ⌫ Er ikke tilladt i koncentrationer på 0,1 ⌦ vægtprocent ⌫ ~~%~~ eller derover i markedsførte stoffer eller præparater. ⌦ 3. Punkt 2 ⌫ ~~Denne bestemmelse~~ gælder dog ikke for: a) brændstoffer, som er omhandlet i ~~direktiv 85/210/EØF~~ ⌦ Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/70/EF af 13. oktober 1998 om kvaliteten af benzin og dieselolie og om ændring af Rådets direktiv 93/12/EØF[6] ⌫ ; b) stoffer og præparater, som er bestemt til anvendelse i industriprocesser, hvor benzenemissioner i større mængder end fastsat i gældende lovgivning ikke er tilladt; c) de affaldsstoffer, som er omhandlet i ⌦ Rådets ⌫ direktiv 75/442/EØF[7] og ⌦ Rådets direktiv ⌫ ~~78/319/EØF~~ ⌦ 91/689/EØF ⌫ [8].
	↓ 83/478/EØF, artikel 2 (tilpasset) ➔1 85/610/EØF, artikel 1
➔1 6. ← Asbestfibre ~~6.1.~~ ⌦ a) ⌫ Crocidolit, CAS-nr. 12001-28-4 ⌦ b) ⌫ Amosit, CAS-nr. 12172-73-5 ⌦ c) ⌫ Anthophyllit~~asbest~~, CAS-nr. 77536-67-5	~~6.1.~~ ⌦ 1. ⌫ Markedsføring og anvendelse af disse fibre og af ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ med indhold af sådanne tilsatte fibre er forbudt. ~~6.2. Markedsføring og anvendelse af disse fibre og af produkter med indhold af sådanne tilsatte fibre er forbudt.~~
	↓ 1999/77/EF, artikel 1 (tilpasset)
⌦ d) ⌫ Actinolit~~asbest~~, CAS-nr. 77536-66-4 ⌦ e) ⌫ Tremolit~~asbest~~, CAS-nr. 77536-68-6	Medlemsstaterne kan imidlertid undtage ⌦ markedsføringen og anvendelsen af ⌫ diafragmer ⌦ indeholdende chrysotil (punkt 6, litra f)) ⌫ til ~~bestående~~ ⌦ eksisterende ⌫ elektrolyseanlæg, ~~for resten af deres levetid, eller~~ indtil der findes egnede asbestfrie

~~6.2.~~ ⌦ f) ⌫ Chrysotil ⌦ [9] ⌫, CAS-nr. 12001-29-5 ⌦ CAS-nr.132207-32-0 ⌫	erstatningsprodukter ⌦ , eller i mangel af sådanne erstatningsprodukter i resten af deres levetid ⌫ ~~, hvilket tidspunkt der måtte være tidligst~~. Kommissionen tager denne ~~afvigelse~~ ⌦ undtagelsesbestemmelse ⌫ op til fornyet overvejelse inden den 1. januar 2008. ⌦ 2. ⌫ Anvendelsen af ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , som indeholder de i punkt ~~6.1 og 6.2~~ ⌦ 1 ovenfor ⌫ nævnte asbestfibre, og som allerede var installeret og/eller i drift inden ~~datoen for medlemsstatens gennemførelse af direktiv 1999/77/EF~~ ⌦ 1. januar 2005 ⌫ , er fortsat tilladt, indtil de bortskaffes, eller ⌦ i resten ⌫ ~~indtil slutningen~~ af deres levetid ~~er nået~~. Medlemsstaterne kan imidlertid af hensyn til beskyttelsen af sundheden ~~inden for deres territorium~~ forbyde anvendelsen af sådanne ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , inden de bortskaffes, eller ~~inden slutningen~~ ⌦ i resten ⌫ af deres levetid ~~er nået~~.

	⬇ 1999/77/EF, artikel 2, stk. 3 (tilpasset)
	⌦ Fra ikrafttrædelsen af denne forordning og indtil den 1. januar 2005 må medlemsstaterne ikke tillade nye anvendelsesformål for chrysotilasbest på deres område. ⌫

	⬇ 1999/77/EF, artikel 1 (tilpasset)
	⌦ 3. ⌫ ~~Med forbehold af andre fællesskabsforskrifter for~~ ⌦ Medmindre andet er fastsat i andre fællesskabsbestemmelser om ⌫ klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, kan markedsføring og anvendelse ⌦ af disse fibre og ⌫ af ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ med indhold af disse fibre, som er godkendt ~~under de tidligere afvigelser~~ ⌦ i henhold til ovennævnte undtagelsesbestemmelser ⌫ , kun tillades, hvis ~~produkterne~~ ⌦ artiklerne ⌫ er forsynet med en etiket, der er i overensstemmelse med ~~bilag II til direktiv 76/769/EØF~~ ⌦ tillæg 7 til denne forordning ⌫ .

	↓ 83/264/EØF, artikel 1 (tilpasset) ⇨ nyt
~~8.~~ ⌦ 7. ⌫ Tris (1-Aziridinyl) phosphinoxid CAS-nr. 5455-55-1	Er ikke tilladt i tekstilvarer, der er bestemt til at komme i berøring med huden, f.eks. beklædningsgenstande, underbeklædningsgenstande og linned.
~~9.~~ ⌦ 8. ⌫ ⌦ Polybrombiphenyler ⌫ Polybromerede biphenyler (PBB) CAS-nr. 59536-65-1	
~~10.~~ ⌦ 9. ⌫ Pulver af kvillajabark (Quillaja saponaria) og dets forbindelser, som indeholder saponin Pulver af henholdsvis Helleborus viridisrod og Helleborus nigerrod Pulver af henholdsvis hvid og sort nyserod (*veratrum album* og *veratrum nigrum*) Benzidin og/eller dets forbindelser ⌦ CAS-nr. 92-87-5 EINECS-nr. 202-199-1 ⌫ *o*-Nitrobenzaldehyd CAS-nr. 552-89-6 Træstøv	⌦ 1. ⌫ Er ikke tilladt i spøg- og skæmtgenstande eller genstande, der anvendes som sådanne, f.eks. nysepulver og stinkbomber. ~~Medlemsstaterne kan dog på deres eget område tillade stinkbomber med et indhold på højst 1,5 ml.~~ ⇨ 2. Punkt 1 finder dog ikke anvendelse på stinkbomber med et indhold på højst 1,5 ml ⇦ .

~~11.~~ ⌦ 10. ⌫ Ammoniumsulfid CAS-nr. 12135-76-1 Ammoniumhydrogensulfid CAS-nr. 12124-99-1 Ammoniumpolysulfid ~~CAS-nr. 12259-92-6~~ ⌦ CAS-nr- 9080-17-5 EINECS-nr. 232-989-1 ⌫	
~~12.~~ ⌦ 11. ⌫ Flygtige estere af bromacetat: Methylbromacetat CAS-nr. 96-32-2 ⌦ EINECS-nr. 202-499-2 ⌫ Ethylbromacetat CAS-nr. 105-36-2 ⌦ EINECS-nr. 203-290-9 ⌫ Propylbromacetat ⌦ CAS-nr. 35223-80-4 ⌫ Butylbromacetat	

	↓ 89/677/EØF, artikel 1, nr. 4 (tilpasset) →1 Berigtigelse 89/677/EØF (EFT L 250 af 23.9.1999, s. 14)
~~13.~~ ⌦ 12. ⌫ 2-naphtylamin CAS-nr. 91-59-8 ⌦ EINECS-nr. 202-080-4 ⌫ og salte heraf	⌦ 1. ⌫ Er ikke tilladt i koncentrationer på 0,1 vægtprocent eller derover i markedsførte stoffer og præparater.

~~14.~~ ⌦ 13. ⌫ Benzidin CAS-nr. 92-87-5 ⌦ EINECS-nr. 202-199-1 ⌫ og salte heraf	Denne bestemmelse gælder dog ikke affaldsstoffer, som indeholder et eller flere af disse stoffer, og som er omhandlet i direktiv 75/442/EØF og ~~78/319/EØF~~ ⌦ 91/689/EØF ⌫ .
~~15.~~ ⌦ 14. ⌫ 4-nitrodiphenyl CAS-nr. 92-93-3 ⌦ EINECS-nr. 202-204-7 ⌫	
~~16.~~ ⌦ 15. ⌫ 4-aminodiphenyl ⌦ xenylamin ⌫ CAS-nr. 92-67-1 ⌦ EINECS-nr. 202-177-1 ⌫ og salte heraf	⌦ 2. ⌫ Sådanne stoffer og præparater må ikke sælges til ~~det brede publikum~~ ⌦ privat brug ⌫ . ⌦ 3. ⌫ Medmindre andet er fastsat i andre fællesskabsbestemmelser ~~vedrørende~~ ⌦ om ⌫ klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal emballagen for sådanne præparater ~~være forsynet med følgende tekst, som skal være læselig, og som ikke må kunne udviskes~~ ⌦ bære følgende påskrift, der skal være let læselig og uudslettelig ⌫ : »Forbeholdt erhvervsmæssige brugere.«
~~17.~~ ⌦ 16. ⌫ Blycarbonater ⌦ a) ⌫ ~~-~~ vandfrit neutralt Pb CO_3 CAS-nr. 598-63-0 ⌦ EINECS-nr. 209-943-4 ⌫ ⌦ b) ⌫ ~~-~~➔$_1$ tribly-bis(carbonat)-dihydroxid ← 2 Pb CO_3 $Pb(OH)_2$ CAS-nr. 1319-46-6 ⌦ EINECS-nr. 215-290-6 ⌫	~~Ikke tilladt som stoffer og bestanddele af præparater bestemt til anvendelse som maling bortset fra restaurering og vedligeholdelse af kunstværker samt historiske bygninger, herunder det indvendige af disse, hvis en medlemsstat i overensstemmelse med ILO-konvention nr. 13 om anvendelse af blyhvidt i maling ønsker at give tilladelse hertil inden for sit eget territorium.~~

~~18.~~ ⌦ 17. ⌫ Blysulfater ⌦ a) ⌫ $PbSO_4$ (1:1) CAS-nr. 7446-14-2 ⌦ EINECS-nr. 231-198-9 ⌫ ⌦ b) ⌫ $Pb_x SO_4$ CAS-nr. 15739-80-7 ⌦ EINECS-nr. 239-831-0 ⌫	Ikke tilladt ~~som stoffer og~~ ⌦ alene eller som ⌫ bestanddele af præparater bestemt til anvendelse som maling bortset fra restaurering og vedligeholdelse af kunstværker samt historiske bygninger, herunder det indvendige af disse, hvis en medlemsstat i overensstemmelse med ILO-konvention nr. 13 om anvendelse af ⌦ blyhvidt og ⌫ blysulfater i maling ønsker at give tilladelse hertil ~~inden for sit eget territorium~~ ⌦ på deres eget område ⌫ .
~~19.~~ ⌦ 18. ⌫ Kviksølvforbindelser	⌦ 1. ⌫ Ikke tilladt ~~som stoffer og bestanddele~~ ⌦ alene eller som bestanddele af ⌫ ~~til~~ præparater bestemt til: a) at hindre ~~tilvoksning~~ ⌦ tilgroning ⌫ med mikroorganismer, planter eller dyr på: – skibsskrog; – bure, flåd, net samt alle andre former for apparatur eller udstyr anvendt i havbrug og skaldyrbrug; – samt på apparatur eller udstyr nedsænket helt eller delvis i vand; b) træbeskyttelse; c) imprægnering af svære industritekstiler og garn bestemt til fremstilling heraf; d) til behandling af industrivand, uanset dettes anvendelse.

	🡻 98/101/EF, artikel 1, nr. 1 (tilpasset)
	⌦ 2. ⌫ M~~edlemsstaterne forbyder senest med virkning fra 1. januar 2000 m~~arkedsføring af batterier og akkumulatorer med over 0,0005 vægtprocent kviksølv, også i sådanne tilfælde hvor disse batterier og akkumulatorer er indbyggede i apparater ⌦ , er ikke tilladt ⌫ . Knapceller og batterier sammensat af knapceller med højst 2 vægtprocent kviksølv er undtaget fra dette forbud.

		↓ 2003/2/EF, artikel 1 (tilpasset)
~~20.~~ ⌦ 19. ⌫ Arsenforbindelser	1.	Ikke tilladt ~~som stoffer og~~ ⌦ alene eller som bestanddele ⌫ af præparater bestemt til: a) at hindre ~~tilvoksning~~ ⌦ tilgroning ⌫ med mikroorganismer, planter eller dyr på: – skibsskrog – bure, flåd, net samt andre former for apparatur eller udstyr anvendt i havbrug eller skaldyrbrug – apparatur eller udstyr nedsænket helt eller delvis i vand b) træbeskyttelse. Således behandlet træ må desuden ikke markedsføres c) som undtagelse herfra: i) hvad angår stoffer og præparater til træbeskyttelse: disse må kun anvendes i industrianlæg, som anvender vakuum eller tryk ved imprægnering af træ, hvis det drejer sig om opløsninger af uorganiske forbindelser af kobber, chrom og arsen (CCA), af C-typen. Således behandlet træ må ikke markedsføres, før beskyttelsesmidlet er fuldstændig fikseret

ii) hvad angår træ behandlet med CCA-opløsninger i industrianlæg i overensstemmelse med ⌦ nr. ⌫ i): dette kan markedsføres til erhvervsmæssig (professionel) og industriel brug, forudsat at træets holdbarhed er nødvendig for menneskers eller kvægets sikkerhed, og at det er usandsynligt, at den almene befolkning kommer i hudkontakt hermed i dets brugslevetid:

- som konstruktionstræ i offentlige bygninger og landbrugsbygninger, kontorbygninger og industribygninger
- i broer og broværk
- som tømmerkonstruktioner i ferskvandsområder og brakvand, f.eks. anløbsbroer og andre broer
- som støjvolde
- til beskyttelse mod lavineskred
- til sikkerhedsrækværk og autoværn på motorveje
- som hegnspæle af rundt, afbarket nåletræ til indhegning af kvæg
- til konstruktioner til jordafstivning
- til pæle til elkrafttransmission og telekommunikation
- som sveller i undergrundsjernbaner

Medmindre andet er fastsat i andre fællesskabsbestemmelser ~~vedrørende~~ ⌦ om ⌫ klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal alt behandlet træ, der markedsføres, være mærket individuelt med påskriften «Udelukkende til erhvervsmæssig (professionel) og industriel anvendelse, indeholder arsen». Desuden skal træ, der markedsføres i emballage, være forsynet med en etiket med påskriften «Brug handsker, når træet håndteres. Brug en støvmaske og øjenværn, når træet skæres op eller bearbejdes på anden måde. Affald fra dette træ skal behandles som farligt af en virksomhed, som er godkendt til dette»

iii) behandlet træ som anført under ~~punkt~~ ⌦ nr. ⌫ i) og ii) ovenfor må ikke anvendes:

– i boligbyggeri, uanset formålet

– på steder, hvor der er risiko for gentagen kontakt med huden

– i havvand

– til landbrugsmæssige formål bortset fra hegnspæle til indhegning af kvæg og anvendelse til konstruktion i overensstemmelse med ~~punkt~~ ⌦ nr. ⌫ ii) ovenfor

– på steder, hvor det behandlede træ kan komme i kontakt med mellemprodukter eller færdigvarer beregnet til føde for mennesker og/eller dyr

	2.	Ikke tilladt ~~som stoffer og~~ ⌦ alene eller som ⌫ bestanddele af præparater bestemt til behandling af industrivand, uanset dettes anvendelse.

↓ 2002/62/EF, artikel 1 (tilpasset)

~~21.~~ ⌦ 20. ⌫ Organiske tinforbindelser	1.	Må ikke markedsføres til anvendelse ⌦ alene eller ⌫ som ~~stoffer og~~ bestanddele ⌦ af ⌫ ~~i~~ præparater, der fungerer som biocider i maling, hvor der ikke er nogen kemisk binding mellem malingens forskellige bestanddele (også kaldet "free association antifouling paint").
	2.	Må ikke markedsføres eller anvendes ⌦ alene eller ⌫ som ~~stoffer og~~ bestanddele ⌦ af ⌫ ~~i~~ præparater, der fungerer som biocider, bestemt til at hindre tilgroning med mikroorganismer, planter eller dyr på a) alle fartøjer, uanset længde, bestemt til anvendelse på havet, langs kysterne, i flodmundinger og på indre vandveje og søer b) bure, flåd, net samt alle andre former for apparatur eller udstyr anvendt i havbrug eller skaldyrbrug c) samt på apparatur eller udstyr nedsænket helt eller delvis i vand
	3.	Må ikke anvendes ⌦ alene eller ⌫ som ~~stoffer og~~ bestanddele af præparater bestemt til behandling af industrivand.

↓ 89/677/EØF, artikel 1, nr. 4 (tilpasset)

~~22.~~ ⌦ 21. ⌫ di-μ-oxo-di-n-butylstanniohydroxyboran ⌦ dibutyltinhydrogenborat ⌫ $C_8H_{19}BO_3S_n$ (DBB) CAS-nr. 75113-37-0 ⌦ ELINCS-nr. 401-040-5 ⌫	Er ikke tilladt i koncentrationer på 0,1 % eller derover i stoffer eller bestanddele i markedsførte præparater. Denne bestemmelse gælder dog ikke for dette stof (DBB) og præparater med indhold heraf, der udelukkende omdannes til færdigvarer med en koncentration af stoffet på under ⌦ 0,1 % ⌫ ~~0,01 % eller derunder~~.

	↓ 1999/51/EF, artikel 1 og bilag nr. 2 (tilpasset)
~~23.~~ ⊠ 22. ⌫ Pentachlorphenol CAS-nr. 87-86-5	⊠ 1. ⌫ Er ikke tilladt i koncentrationer på 0,1 vægtprocent eller derover i markedsførte stoffer og præparater.

⌦ EINECS-nr. 201-778-6 ⌫	⌦ 2. Overgangsbestemmelser: ⌫
samt salte og estere heraf	Undtagelsesvis kan Frankrig, Irland, Portugal, Spanien og Det Forenede Kongerige indtil den 31. december 2008 vælge ikke at anvende denne bestemmelse på stoffer og præparater, der skal anvendes i industrianlæg, som ikke giver mulighed for emission og/eller udledning af pentachlorphenol (PCP) i større mængder end fastsat i forskrifterne efter gældende lovgivning: a) til behandling af træ. Dog må behandlet træ ikke anvendes: – til dekorative eller andre formål inde i bygninger uanset disses bestemmelse (beboelse, arbejde, fritid) – til fremstilling og genbehandling af: i) beholdere, der skal anvendes til dyrkning ii) emballage, som kan komme i kontakt med råvarer, ~~varer på mellemstadiet~~ ⌦ mellemprodukter ⌫ eller færdigvarer, som er bestemt til konsum og/eller foder iii) andre materialer, der kan kontaminere produkter nævnt under ⌦ nr. ⌫ i) og ii) b) til imprægnering af fibre og svære tekstilvarer, som hverken må være bestemt til beklædning eller til indendørsdekoration c) som særlig undtagelse kan medlemsstaterne i enkelte tilfælde tillade, at specialiserede fagfolk på medlemsstatens ~~territorium~~ ⌦ område ⌫ på stedet og for bygninger af kulturel, kunstnerisk eller historisk betydning, eller i nødstilfælde, foretager en reparation og behandling af tømmer og murværk, som er inficeret med ægte hussvamp *(Serpula lacrymans)* og tyndkødet hussvamp.

	Under alle omstændigheder: a) må det totale indhold af hexachlorodibenzoparadioxin (HCDD) i pentachlorphenol, der anvendes ⌦ alene ⌫ ~~som sådan~~ eller som bestanddel af præparater, der benyttes i henhold til ovennævnte undtagelsesbestemmelser, højest være på 2 milliontedele (ppm) b) må disse stoffer og præparater: – kun markedsføres i emballager, som kan rumme mindst 20 liter – ikke sælges til ~~offentligheden~~ ⌦ privat brug ⌫ . ⌦ 3. ⌫ Medmindre andet er fastsat i andre fællesskabsbestemmelser ~~vedrørende~~ ⌦ om ⌫ klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal emballagen for ~~sådanne~~ ⌦ de stoffer og ⌫ præparater ⌦ , der er omfattet af punkt 1 og 2, ⌫ ~~være forsynet med følgende tekst, som skal være letlæselig, og som ikke må kunne udviskes~~ ⌦ bære følgende påskrift, der skal være let læselig og uudslettelig ⌫ : »Forbeholdt industriel og erhvervsmæssig brug.« Undtaget fra disse bestemmelser er ~~endvidere~~ affald, som er omfattet af direktiv 75/442/EØF og 91/689/EØF.

	↓ 91/338/EØF, artikel 1 (tilpasset)
~~24.~~ ⌦ 23. ⌫ Cadmium ⌦ CAS-nr. 7440-43-9 ⌫ ⌦ EINECS-nr. 231-152-8 ⌫ og forbindelser heraf	1.~~1.~~ Må ikke anvendes til farvning af færdigvarer fremstillet på basis af følgende stoffer og præparater: – ⌦ a) ⌫ polyvinylchlorid (PVC) (3904 10, 3904 21, 3904 22) [10] – polyurethaner (PUR) (3909 50) – polyethylen med lav densitet (LDPE) bortset fra polyethylen med lav

densitet anvendt til fremstilling af farvet masterbatch (3901 10)

– celluloseacetat (CA) (3912 11, 3912 12)

– celluloseacetobutyrat (CAB) (3912 11, 3912 12)

– epoxiharpikser (3907 30)

~~Under alle omstændigheder må færdigvarer eller bestanddele heraf, som er fremstillet af ovennævnte stoffer og præparater, farvet med cadmium, uanset deres anvendelse eller endelige formål ikke markedsføres, hvis deres indhold af cadmium (udtrykt som frit Cd) overstiger 0,01 vægtprocent af plastmaterialet.~~

~~1.2. Punkt 1.1 finder fra den 31. december 1995 ligeledes anvendelse for:~~

~~a) Færdigvarer fremstillet af følgende stoffer og præparater:~~

– melaminformaldehyd-harpikser (MF) (3909 20)

– carbamidplast (UF) (3909 10)

– umættede polyestre (UP) (3907 91)

– polyethylenterephthalat (PET) (3907 60)

– polybutylenterephthalat (PBT)

– almindelig/transparent polystyren (3903 11, 3903 19)

– acrylonitrilmethylmethacrylat (AMMA)

– tværbunden polyethylen (VPE)

– slagfast polystyren

– polypropylen (PP) (3902 10)

b) malinger og lakker (3208, 3209)

Såfremt malingerne og lakkerne har et

	højt indhold af zink, skal koncentrationerne af urenheder af cadmium være så lave som muligt og må under ingen omstændigheder overstige 0,1 vægtprocent.	
Under alle omstændigheder må færdigvarer eller bestanddele heraf, som er fremstillet af ovennævnte stoffer og præparater, farvet med cadmium, uanset deres anvendelse eller endelige formål ikke markedsføres, hvis deres indhold af cadmium (udtrykt som frit Cd) overstiger 0,01 vægtprocent af plastmaterialet.		
~~1.3.~~ ⌦ 2. ⌫ Punkt ~~1.1 og 1.2~~ ⌦ 1 ⌫ finder dog ikke anvendelse på ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , der farves af sikkerhedsmæssige grunde.		
~~2.1.~~ ⌦ 3. ⌫ Er ikke tilladt til stabilisering af nedennævnte færdigvarer fremstillet af vinylchloridpolymerer og -copolymerer:		
	– emballagegenstande (sække og poser, beholdere, flasker, låg) (392329 10) (3920 41) (3920 42)	10
	– kontor- og skoleartikler (3926 10)	
	– beslag og tilbehør til møbler, vognmagerarbejder og lignende (3926 30)	
	– beklædningsgenstande (herunder handsker) og tilbehør dertil (3926 20)	
	– gulvbelægning og vægbeklædning (3918 10)	
	– imprægnerede, overtrukne, belagte eller laminerede stoffer (5903 10)	
	– kunstlæder(4202)	
	– grammofonplader (8524 10)	
	– rør og fittings (3917 23)	
	– svingdøre (»saloon«-døre)	
	– køretøjer til vejtransport (indvendig, udvendig, undervogn)	
	– beklædning af stålplader til brug i byggeriet eller i industrien	

– isolering af elkabler

Under alle omstændigheder må ovennævnte ⌦ færdigvarer ⌫ eller bestanddele heraf, som er fremstillet af vinylchloridpolymerer eller -copolymerer stabiliseret med cadmiumholdige stoffer, uanset deres anvendelse eller endelige formål ikke markedsføres, hvis deres indhold af cadmium (udtrykt som frit Cd) overstiger 0,01 vægtprocent af plastmaterialet.

~~Disse bestemmelser træder i kraft den 30. juni 1994.~~

~~2.2.~~ ⌦ 4. ⌫ Punkt ~~2.1~~ ⌦ 3 ⌫ finder dog ikke anvendelse på færdigvarer, hvortil der anvendes cadmiumbaserede stabilisatorer af sikkerhedsmæssige grunde.

~~3.~~ ⌦ 5. ⌫ I ~~dette direktiv~~ ⌦ denne forordning ⌫ forstås ved overfladebehandling med cadmium (cadmiering) enhver påføring eller dækning af en metaloverflade med metallisk cadmium.

~~3.1.~~ Ikke tilladt til cadmiering af ~~metalprodukter~~ ⌦ metalartikler ⌫ eller bestanddele af ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , som anvendes i nedennævnte sektorer eller til nedennævnte formål:

a) udstyr og maskiner til

– levnedsmiddelproduktion (8210) (8417 20) (8419 81) (8421 11) (8421 22) (8422) (8435, 8437, 8438) (8476 11)

– landbrug (8419 31) (8424 81) (8432, 8433) (8434, 8436)

– køling og frysning (8418)

– trykning og bogbinderi (8440) (8442) (8443)

10

b) udstyr og maskiner til produktion af:

– husholdningsredskaber (7321) (8421 12) (8450) (8509) (8516) [10]

– møbler (8465, 8466) (9401, 9402) (9403, 9404)

– sanitære installationer (7324)

– centralvarme- og luftkonditioneringsanlæg (7322) (8403, 8404) (8415)

Under alle omstændigheder må cadmierede færdigvarer eller bestanddele heraf, som anvendes i de sektorer eller til de formål, der er anført i litra a) og b) ovenfor, samt ~~varer~~ ⌦ artikler ⌫ fremstillet i de i litra b) ovenfor omhandlede sektorer, uanset deres anvendelse eller endelige formål, ikke markedsføres.

~~3.2.~~ ⌦ 6. ⌫ De i punkt ~~3.1~~ ⌦ 5 ⌫ omhandlede bestemmelser finder ~~fra den 30. juni 1995~~ ligeledes anvendelse på cadmierede ~~varer~~ ⌦ artikler ⌫ eller bestanddele heraf, som anvendes i de sektorer eller til de formål, der er nævnt i litra a) og b) nedenfor, samt på ~~varer~~ ⌦ artikler ⌫ fremstillet i de i litra b) nedenfor omhandlede sektorer:

a) udstyr og maskiner til produktion af:

– papir og karton (8419 32) (8439) (8441) [10]

– tekstil og beklædning (8444) (8445, 8447) (8448, 8449, 8451) (8452)

b) udstyr og maskiner til produktion af:

– redskaber til industriel håndtering (8425, 8426, 8427) (8428) (8429) (8430) (8431) [10]

– landevejs- og landbrugskøretøjer (kapitel 87)

– rullende jernbanemateriel (kapitel 86)

– skibe (kapitel 89)

~~3.3.~~ ⌦ 7. ⌫ ~~Punkt 3.1 og 3.2~~ ⌦ Begrænsningerne i punkt 5 og 6 ⌫ finder dog ikke anvendelse på:

– ~~varer~~ ⌦ artikler ⌫ og bestanddele af ~~varer~~ ⌦ artikler ⌫ , som anvendes i luftfarts- og rumfartssektoren, til minedrift, i offshoreindustrien og den nukleare sektor, hvor der kræves en høj grad af sikkerhed, samt i sikkerhedsudstyr i landevejs- og landbrugskøretøjer, i rullende jernbanemateriel og i skibe;

– elektriske kontakter, uanset anvendelsesområde, for at sikre pålideligheden af det apparatur, hvori de installeres.

↓ 91/338/EØF, artikel 2 (tilpasset)

⌦ Som følge af udviklingen med hensyn til viden og teknikker for så vidt angår mindre farlige erstatningsstoffer for cadmium og cadmiumforbindelser tager Kommissionen i samråd med medlemsstaterne situationen op til fornyet vurdering med regelmæssige mellemrum efter fremgangsmåden i artikel 113, stk. 3, i denne forordning. ⌫

↓ 1999/51/EF, artikel 1 og bilag nr. 3 (tilpasset)

~~4. Østrig og Sverige, der allerede anvender begrænsninger for cadmium, som går videre end dem, der er foreskrevet i afsnit 1, 2 og 3, må fortsætte med at anvende disse begrænsninger indtil den 31. december 2002. Kommissionen vil inden da tage bestemmelserne om cadmium i bilag I til direktiv 76/769/EØF op til fornyet overvejelse på baggrund af resultaterne fra risikovurderinger for cadmium og udviklingen med hensyn til viden og teknik for så vidt angår erstatningsstoffer for cadmium.~~

	↓ 91/339/EØF, artikel 1 (tilpasset)
~~25.~~⌦ 24. ⌫Monomethyltetrachlorodiphenylmethan Handelsnavn: Ugilec 141 CAS-nr. 76253-60-6	⌦ 1. ⌫ ~~Fra den 18. juni 1994 forbydes markedsføring~~ ⌦ Markedsføring ⌫ og anvendelse af dette stof samt af præparater og ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ indeholdende dette stof ⌦ er forbudt ⌫ . ⌦ 2. ⌫ Som en undtagelse finder ⌦ punkt 1 ⌫ ~~denne bestemmelse~~ ikke anvendelse ⌦ på ⌫ : ~~1)~~ ⌦ a) ⌫ ~~for~~ anlæg og maskiner, som allerede var i brug den 18. juni 1994, indtil disse anlæg og maskiner kasseres. ~~Fra den 18. juni 1994 kan medlemsstaterne~~ ⌦ Medlemsstaterne kan ⌫ dog af hensyn til sundheden og miljøet på deres område forbyde anvendelsen af disse anlæg og maskiner, inden de kasseres. ~~2)~~ ⌦ b) ⌫ ~~for~~ vedligeholdelse af anlæg og maskiner, som allerede var i brug ⌦ i en medlemsstat ⌫ den 18. juni 1994. ⌦ 3. ⌫ ~~Fra den 18. juni 1994 forbydes brugthandel~~ ⌦ Brugthandel ⌫ med dette stof samt med præparater og anlæg eller maskiner indeholdende dette stof ⌦ er forbudt ⌫ .
~~26.~~⌦ 25. ⌫Monomethyldichlorodiphenylmethan Handelsnavn: Ugilec 121, Ugilec 21 CAS-nr. ukendt	Markedsføring og anvendelse af dette stof samt af præparater og ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ indeholdende dette stof forbydes.
~~27.~~⌦ 26. ⌫Monomethyldibromodiphenylmethan ⌦ bromobenzylbromotoluen, blanding af isomerer ⌫ Handelsnavn: DBBT CAS-nr. 99688-47-8	Markedsføring og anvendelse af dette stof samt af præparater og ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ indeholdende dette stof forbydes.

	↓ 94/27/EF, artikel 1 (tilpasset)
~~28.~~ ⌦ 27. ⌫ Nikkel CAS-nr. 7440-02-0 EINECS-nr. ~~2311114~~ ⌦ 231-111-4 ⌫ og forbindelser heraf	⌦ 1. ⌫ Må ikke anvendes: ~~1)~~ ⌦ a) ⌫ i stikkere, som indsættes i hullede ører og andre hullede legemsdele under helingen af det sår, der opstår, når hullet laves, uanset om de senere fjernes, medmindre de pågældende stikkere er homogene og nikkelkoncentrationen — udtrykt som nikkelmassens procentdel af den samlede masse — er på under 0,05 % ~~2)~~ ⌦ b) ⌫ i ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , der er beregnet til at komme i direkte og langvarig berøring med huden, som f.eks. – øreringe – halskæder, armbånd og -lænker, fodlænker og fingerringe – bagkapsler på armbåndsure, urremme og -spænder – nittede knapper, spænder, nitter, lynlåse og metalmærker i beklædningsgenstande såfremt nikkelafgivelsen fra de dele deraf, der kommer i direkte og langvarig berøring med huden, er større end 0,5 µg/cm^2/uge ~~3)~~ ⌦ c) ⌫ i ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , som dem der er anført i punkt ~~2~~ ⌦ 1, litra b) ⌫ , hvor disse er forsynet med en nikkelfri belægning, medmindre denne belægning er tilstrækkelig til at sikre, at nikkelafgivelsen fra de dele af disse ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , der kommer i direkte og langvarig berøring med huden, ikke er større end 0,5 µg/cm^2/uge i en periode på mindst to år ved normal anvendelse af ~~produkter~~ ⌦ disse artikler ⌫ . ⌦ 2. ⌫ ~~Endvidere må produkter~~ ⌦ Artikler ⌫ , som er omfattet af ovenstående punkt ~~1, 2 og 3~~ ⌦ 1, litra a)-c), må ⌫ ikke markedsføres, medmindre de er i overensstemmelse med kravene i disse punkter.

	↓ 94/27/EF, artikel 2, stk. 1 (tilpasset)
	⌦ De standarder, der vedtages af Den Europæiske Standardiseringsorganisation (CEN), anvendes som analysemetode til kontrol af overensstemmelse med punkt 1 og 2. ⌫

	↓ 97/10/EF, artikel 1 (tilpasset) ➔1 97/56/EF, artikel 1, nr. 1 ➔2 Berigtigelse 97/10/EF (EFT L 216 af 14.8.1999, s. 25)
~~29.~~ ⌦ 28. ⌫ Stoffer anført i bilag I til ⌦ Rådets ⌫ direktiv 67/548/EØF ⌦ [11] ⌫, klassificeret som kræftfremkaldende i kategori 1 eller 2 og mindst mærket som giftigt (T) med risikosætning R 45: "kan fremkalde kræft", eller risikosætning R 49: "kan fremkalde kræft ved indånding", og med følgende betegnelser: Kræftfremkaldende i kategori 1 ~~: Jf. liste 1 i tillægget~~ ⌦ , opført på listen i tillæg 1. ⌫ Kræftfremkaldende i kategori 2 ~~: Jf. liste 2 i tillægget~~ , ⌦ opført på listen i tillæg 2. ⌫	Medmindre andet er fastsat i andre ~~punkter i~~ ⌦ dele i dette ⌫ bilag ⌦ , finder følgende anvendelse på punkt 28-30 ⌫ ~~I til direktiv 76/769/EØF~~: ⌦ 1. ⌫ Må ikke anvendes i stoffer og præparater, som markedsføres med henblik på salg til private i koncentrationer på eller over: – dem, der er fastsat i bilag I til Rådets direktiv 67/548/EØF[12] – eller dem, der er fastsat i ~~punkt 6 i tabel VI i bilag I til Rådets direktiv 88/379/EØF[13] såfremt der ikke er fastsat nogen koncentrationsgrænse i bilag I til direktiv 67/548/EØF~~ ⌦ direktiv 1999/45/EF ⌫ . Medmindre andet ~~gælder ifølge Fællesskabets bestemmelser~~ ⌦ er fastsat i andre fællesskabsbestemmelser ⌫ om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal emballagen til sådanne stoffer og præparater ~~være læseligt og uudsletteligt mærket med~~ ⌦ bære følgende påskrift, der skal være let læselig og uudslettelig ⌫ : »Udelukkende til erhvervsmæssig brug«. ⌦ 2. ⌫ Som undtagelsesbestemmelse gælder ~~denne bestemmelse~~ ⌦ punkt 1 ⌫ ikke for: a) lægemidler til mennesker eller dyr, som defineret i ⌦ Europa-Parlamentets og ⌫ Rådets direktiv ~~65/65/EØF~~ ⌦ 2001/82/EF ⌫ [14] ⌦ og Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/83/EF[15] ⌫ b) kosmetiske midler som defineret i Rådets

direktiv 76/768/EØF[16]

c) → 2 – motorbrændstoffer, som er omfattet af direktiv ~~85/210/EØF~~[17] ⌦ 98/70/EF ⌫

– mineraloliederivater, der er bestemt til at anvendes som brændsel eller brændstof i mobile eller faste fyringsanlæg

– brændsel solgt i lukkede systemer (f.eks. gasflasker med flydende gas) ←

d) kunstnerfarver, der er omfattet af ~~Rådets~~ direktiv ~~88/379/EØF~~[18] ⌦ 1999/45/EF ⌫ .

~~30.~~ ⌦ 29. ⌫ Stoffer anført i bilag I til direktiv 67/548/EØF, klassificeret som mutagene i kategori 1 eller 2 og mærket med risikosætning R 46: "kan forårsage arvelige genetiske skader", og med følgende betegnelser:

Mutagene i kategori 1~~: Jf. liste 3 i tillægget~~ ⌦ , opført på listen i tillæg 3. ⌫

Mutagene i kategori 2~~: Jf. liste 4 i tillægget~~ ⌦ , opført på listen i tillæg 4. ⌫

~~Medmindre andet er fastsat i andre punkter i bilag I til direktiv 76/769/EØF:~~

~~Må ikke anvendes i stoffer og præparater, som markedsføres med henblik på salg til private i koncentrationer på eller over:~~

– ~~dem, der er fastsat i bilag I til direktiv 67/548/EØF~~

– ~~eller dem, der er fastsat i punkt 6 i tabel VI i bilag I til direktiv 88/379/EØF, såfremt der ikke er fastsat nogen koncentrationsgrænse i bilag I til direktiv 67/548/EØF.~~

→ 1 ~~Medmindre andet gælder ifølge Fællesskabets bestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal emballagen til sådanne stoffer og præparater være læseligt og uudsletteligt mærket med: «Udelukkende til erhvervsmæssig brug».~~ ←

~~Som undtagelsesbestemmelser gælder denne bestemmelse ikke for:~~

~~a) lægemidler til mennesker eller dyr, som defineret i direktiv 65/65/EØF~~

~~b) kosmetiske midler som defineret i direktiv 76/768/EØF~~

~~c)~~ → 2 – ~~motorbrændstoffer, som er omfattet af direktiv 85/210/EØF~~[7]

– ~~mineraloliederivater, der er bestemt til at anvendes som brændsel eller brændstof i mobile eller faste fyringsanlæg~~

	– ~~brændsel solgt i lukkede systemer (f.eks. gasflasker med flydende gas)~~ ←
	~~d) kunstnerfarver, der er omfattet af direktiv 88/379/EØF.~~
~~31.~~ ⌦ 30. ⌫ Stoffer anført i bilag I til direktiv 67/548/EØF, klassificeret som reproduktionstoksiske i kategori 1 eller 2 og mærket med risikosætning R 60: "kan skade forplantningsevnen", og eller R61: "kan skade barnet under graviditeten", og med følgende betegnelser:	~~Medmindre andet er fastsat i andre punkter i bilag I til direktiv 76/769/EØF:~~
	~~Må ikke anvendes i stoffer og præparater, som markedsføres med henblik på salg til private i koncentrationer på eller over:~~
	– ~~dem, der er fastsat i bilag I til direktiv 67/548/EØF~~
	– ~~eller dem, der er fastsat i punkt 6 i tabel VI i bilag I til direktiv 88/379/EØF, såfremt der ikke er fastsat nogen koncentrationsgrænse i bilag I til direktiv 67/548/EØF.~~
Reproduktionstoksiske i kategori 1~~: Jf. liste 5 i tillægget~~ ⌦, opført på listen i tillæg 5. ⌫	➔1 ~~Medmindre andet gælder ifølge Fællesskabets bestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal emballagen til sådanne stoffer og præparater være læseligt og uudsletteligt mærket med: «Udelukkende til erhvervsmæssig brug».~~ ←
	~~Som undtagelsesbestemmelse gælder denne bestemmelse ikke for:~~
	~~a) lægemidler til mennesker eller dyr, som defineret i direktiv 65/65/EØF~~
	~~b) kosmetiske midler som defineret i direktiv 76/768/EØF~~
Reproduktionstoksiske i kategori 2~~: Jf. liste 6 i tillægget~~ ⌦, opført på listen i tillæg 6. ⌫	~~c)~~ ➔2 – ~~motorbrændstoffer, som er omfattet af direktiv 85/210/EØF~~[7]
	~~– mineraloliederivater, der er bestemt til at anvendes som brændsel eller brændstof i mobile eller faste fyringsanlæg~~
	– ~~brændsel solgt i lukkede systemer (f.eks. gasflasker med flydende gas)~~ ←
	~~d) kunstnerfarver, der er omfattet af direktiv 88/379/EØF.~~

	↓ 2001/90/EF, artikel 1 (tilpasset)
~~32.~~ ⊠ 31. ⌫ ~~Stoffer og præparater med indhold af et eller flere af følgende stoffer:~~	1. Må ikke anvendes ⊠ alene eller i præparater ⌫ til træbeskyttelse. Endvidere må træ behandlet hermed ikke markedsføres.
a) Creosot ⊠ ; vaskeolie ⌫ ⊠ CAS-nr. 8001-58-9 ⌫ ⊠ EINECS-nr. 232-287-5 ⌫ ~~CAS-nr. 8001-58-9~~	2. Undtagelser:
b) Creosotolie ⊠ ; vaskeolie ⌫ ⊠ CAS-nr. 61789-28-4 ⌫ EINECS-nr. 263-047-8 ~~CAS-nr. 61789-28-4~~	i) Disse stoffer og præparater må kun anvendes til træbeskyttelse i industrianlæg eller til erhvervsmæssig udført genbehandling af træ, der udføres på stedet, og som er omfattet af Fællesskabets bestemmelser om beskyttelse af arbejdstagere, hvis de indeholder: a) en koncentration af benzo-a-pyren på under 0,005 vægtprocent b) og en koncentration af vandekstraherbar tjæresyre på under 3 vægtprocent. Sådanne stoffer og præparater til træbeskyttelse i industrianlæg eller til erhvervsmæssigt udført træbeskyttelse: – må kun markedsføres i emballager med et rumfang på 20 liter og derover – må ikke sælges til private forbrugere. ~~Uden at det berører anvendelsen af~~ ⊠ Medmindre andet er fastsat i ⌫ andre fællesskabsbestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal emballagen til disse stoffer og præparater ~~være læseligt og uudsletteligt mærket~~ ~~med~~ ⊠ bære følgende påskrift, der skal være let læselig og uudslettelig ⌫ : «Udelukkende til brug i industrianlæg og til erhvervsmæssig brug».
c) Destillater (stenkulstjære), naphtalenolier ⊠ ; naphtalenolie ⌫ ⊠ CAS-nr. 84650-04-4 ⌫ EINECS-nr. 283-484-8 ~~CAS-nr. 84650-04-4~~	
d) Creosotolie, acenaphthenfraktion ⊠ ; vaskeolie ⌫ ⊠ CAS-nr. 90640-84-9 ⌫ EINECS-nr. 292-605-3 ~~CAS-nr. 90640-84-9~~	
e) Destillater (stenkulstjære), øvre ⊠ ; tung	ii) Træ behandlet i industrianlæg eller

antracenolie ⌫

⌦ CAS-nr. 65996-91-0 ⌫

EINECS-nr. 266-026-1

~~CAS-nr. 65996-91-0~~

f) Anthracenolie

⌦ CAS-nr. 90640-80-5 ⌫

EINECS-nr. 292-602-7

~~CAS-nr. 90640-80-5~~

g) Tjæresyrer, stenkuls-, rå ⌦ ; råfenol ⌫

⌦ CAS-nr. 65996-85-2 ⌫

EINECS-nr. 266-019-3

~~CAS-nr. 65996-85-2~~

h) Creosot, træ

⌦ CAS-nr. 8021-39-4 ⌫

EINECS-nr. 232-419-1

~~CAS-nr. 8021-39-4~~

i) Lavtemperaturstjæreolie, alkaliekstraheret ⌦ ; ekstraktionsrester (kul), lavtemperatur stenkulstjære, alkaliekstraheret ⌫

⌦ CAS-nr. 122384-78-5 ⌫

EINECS-nr. 310-191-5

~~CAS-nr. 122384-78-5~~

erhvervsmæssigt som nævnt under ⌦ nr. ⌫ i), som markedsføres for første gang, eller som genbehandles på stedet, må kun anvendes til erhvervsmæssig og industriel brug, f.eks. til jernbaner, i forbindelse med el- og teletransmission, til hegn, til landbrugsformål (f.eks. støttepæle til træer) og i havne og indre vandveje.

iii) ⌦ Markedsføringsforbuddet i punkt 1 finder ikke anvendelse på træ ⌫ ~~Træ~~, der ⌦ inden den 31. december 2002 ⌫ er blevet behandlet med de under punkt ~~32~~ ⌦ 31 ⌫ , litra a) til i), nævnte stoffer, ~~før dette direktiv finder anvendelse, er ikke underkastet det i punkt 1 omhandlede markedsføringsforbud, hvis det~~ , og ⌦ som ⌫ markedsføres på brugtmarkedet til genanvendelse.

3. Behandlet træ som nævnt under punkt 2, nr. ii) og iii), ovenfor må dog ikke anvendes:

– inde i bygninger, uanset formål

– i legetøj

– på legepladser

– i parker, haver og udendørs faciliteter til rekreative formål, hvis der er risiko for hyppig hudkontakt

– til fremstilling af havemøbler, f.eks. picnicborde

– til fremstilling og anvendelse og eventuel ~~ny behandling~~ ⌦ genbehandling ⌫ af:

  – beholdere, der skal anvendes til dyrkning

  – emballage, som kan komme i berøring med råvarer, ⌦ mellemprodukter ⌫ ~~varer på mellemstadiet~~ og/eller færdigvarer, som er bestemt til konsum og/eller foder

  – andre materialer, der kan

	kontaminere ovennævnte ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ .

	↓ 96/55/EF, artikel 1 (tilpasset)
~~33.~~ ⌦ 32. ⌫ Chloroform CAS-nr. 67-66-3 ⌦ EINECS-nr. 200-663-8 ⌫	⌦ 1. ⌫ Må ikke anvendes i koncentrationer på eller over 0,1 vægtprocent i stoffer og præparater, som markedsføres til privat brug og/eller til brug i åbne systemer såsom overfladerensning og rensning af vævede stoffer.
~~34.~~ ⌦ 33. ⌫ Tetrachlormethan, ⌦ karbontetraklorid ⌫ CAS-nr. 56-23-5 ⌦ EINECS-nr. 200-262-8 ⌫	⌦ 2. ⌫ Medmindre andet ~~gælder ifølge Fællesskabets bestemmelser~~ ⌦ er fastsat i andre fællesskabsbestemmelser ⌫ om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, skal emballagen til sådanne stoffer og præparater, som indeholder dem i koncentrationer på eller over 0,1 vægtprocent, ~~være læseligt og uudsletteligt mærket med~~ ⌦ bære følgende påskrift, der skal være let læselig og uudslettelig ⌫ : «Udelukkende til brug i industrianlæg.»
~~35.~~ ⌦ 34. ⌫ 1,1,2-trichlorethan CAS-nr. 79-00-5 ⌦ EINECS-nr. 201-166-9 ⌫	Som undtagelsesbestemmelse gælder denne bestemmelse ikke for:
~~36.~~ ⌦ 35. ⌫ 1,1,2,2-tetrachlorethan CAS-nr. 79-34-5 ⌦ EINECS-nr. 201-197-8 ⌫	a) lægemidler til mennesker eller dyr, som defineret i ~~Rådets~~ direktiv ~~65/65/EØF[19], senest ændret ved direktiv 93/39/EØF[20]~~ ⌦ 2001/82/EF og 2001/83/EF ⌫
~~37.~~ ⌦ 36. ⌫ 1,1,1,2-tetrachlorethan CAS-nr. 630-20-6	b) kosmetiske midler som defineret i ~~Rådets~~ direktiv 76/768/EØF[~~21~~], ~~senest ændret ved direktiv 93/35/EØF[22]~~.
~~38.~~ ⌦ 37. ⌫ Pentachlorethan CAS-nr. 76-01-7 ⌦ EINECS-nr. 200-925-1 ⌫	
~~39.~~ ⌦ 38. ⌫ 1,1-dichlorethylen CAS-nr. 75-35-4 ⌦ EINECS-nr. 200-864-0 ⌫	
~~40.~~ ⌦ 39. ⌫ 1,1,1-trichlorethan ⌦ , methylchloroform ⌫	

CAS-nr. 71-55-6 ⌦ EINECS-nr. 200-756-3 ⌫	

↓ 94/48/EF, artikel 1 (tilpasset)

⌦ 40.	Stoffer, der opfylder antændeligshedskriterierne i Rådets direktiv 67/548/EØF, og som klassificeres som antændelige, let antændelige eller yderst antændelige, uanset om de fremgår af direktivets tillæg 1. ⌫ ~~Stoffer, som~~ ~~enten~~ ~~– er nævnt i bilag I til direktiv 67/548/EØF, og som klassificeres som antændelige, let antændelige eller yderst let antændelige og er mærket som sådanne~~ ~~eller~~ ~~– endnu ikke er medtaget i bilag I til direktiv 67/548/EØF, men som opfylder antændelighedskriteriet i bilag VI til direktiv 67/548/EØF, men som foreløbigt klassificeres og mærkes som antændelige, let antændelige eller yderst let antændelige i overensstemmelse~~	1.	Må ikke anvendes ~~som sådanne~~ ⌦ alene ⌫ eller i form af præparater ⌦ i spraydåser ⌫ , der markedsføres ~~med henblik på salg~~ til ~~den brede offentlighed~~ ⌦ privat brug ⌫ som spøg og skæmt eller til dekorative formål som f.eks.: – metalglimmer, der hovedsagelig er til dekorativ brug – kunstig sne og is – pruttepuder – spaghettispray – ekskrementimitationer – tågehorn – konfetti og dekorationsskum – kunstigt spindelvæv – stinkbomber
		2.	~~Uden at dette berører anvendelsen af~~ ⌦ Medmindre andet er fastsat i ⌫ andre fællesskabsbestemmelser ~~vedrørende~~ ⌦ om ⌫ klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer, skal emballagen til ovennævnte spraydåser bære følgende ~~læselige og uudslettelige~~ påskrift ⌦ , der skal være let læselig og uudslettelig ⌫ : «Kun til erhvervsmæssig brug».
		3.	Punkt 1 og 2 gælder dog ikke for spraydåser omhandlet i ⌦ artikel 9a i Rådets ⌫ direktiv 75/324/EØF ⌦ [23] ⌫ ~~, artikel 9a~~.
		4.	⌦ De i punkt 1 og 2 ovenfor anførte ⌫ ~~Ovennævnte produkter~~ ⌦ artikler ⌫ må ikke markedsføres, medmindre de er i overensstemmelse med de her omtalte krav.

	~~med artikel 5, stk. 2, i direktiv 67/548/EØF:~~	

		↓ 2001/91/EF, artikel 1 (tilpasset)
41.	Hexachlorethan CAS-nr. 67-72-1 EINECS-nr. 2006664	Må ikke anvendes til fremstilling eller forarbejdning af non-ferrometaller

		↓ 2002/45/EF, artikel 1 (tilpasset)
42.	Alkaner, C_{10}-C_{13}, chlor (korte chlorparaffiner) ⌦ (SCCP) ⌫ ⌦ EINECS-nr. 287-476-5 ⌫	1. Må ⌦ fra den 6. januar 2004 ⌫ ikke markedsføres til anvendelse ⌦ alene eller ⌫ som ~~stoffer eller som~~ bestanddele i andre stoffer eller præparater i koncentrationer på mere end 1 % – til metalforarbejdning – til indfedtning af læder. ~~2. Inden den 1. januar 2003 tager Kommissionen sammen med medlemsstaterne og Ospar-Kommissionen og under inddragelse af al relevant ny videnskabelig viden om sundheds- og miljørisici ved SCCP alle andre anvendelser af SCCP op til fornyet overvejelse.~~ ~~Europa-Parlamentet underrettes om resultatet af disse overvejelser.~~

		↓ 2003/3/EF, artikel 1 og bilag, første led (tilpasset)
43.	Azofarvestoffer	1. Azofarvestoffer, som ved reduktiv spaltning af en eller flere azogrupper kan frigive en eller flere af de aromatiske aminer i tillæg~~get~~ ⌦ 8 til denne forordning ⌫ i påviselige koncentrationer, dvs. over 30 ppm i færdigvaren eller i de farvede dele heraf målt efter den analysemetode, der er udarbejdet i overensstemmelse med artikel ~~2a i dette direktiv~~ ⌦ 113, stk. 3, i denne forordning ⌫ , må ikke benyttes i tekstil- og lædervarer, som kan komme i direkte berøring i længere tid med

		hud eller mundhule hos mennesker, f.eks.: – beklædningsgenstande, sengelinned, håndklæder, toupéer og parykker, hatte, bleer og andre hygiejneartikler, soveposer – fodtøj, handsker, remme til armbåndsure, håndtasker, punge og tegnebøger, dokumentmapper, stolebetræk, pengekatte – legetøj af tekstil eller læder og legetøj, hvori indgår beklædningsgenstande af tekstil eller læder – garn og stoffer bestemt til den endelige forbruger.
	2.	Endvidere må tekstil- og lædervarer, der er omhandlet i punkt 1, ikke markedsføres, hvis de ikke opfylder kravene i samme punkt. Som en undtagelse gælder denne bestemmelse indtil den 1. januar 2005 ikke for tekstilvarer, der er fremstillet af genbrugte fibre, hvis aminerne er afgivet fra rester, der stammer fra den forudgående farvning af de pågældende fibre, og hvis de på listen nævnte fibre afgives i koncentrationer på under 70 ppm.
	3.	Azofarvestoffer, som er indeholdt i «liste over azofarvestoffer» ⌦ i tillæg 9 til denne forordning ⌫ , ~~som hermed indsættes i tillægget,~~ må ikke markedsføres eller anvendes ⌦ alene eller som bestanddel af præparater ⌫ til farvning af tekstil- og lædervarer ~~som stof eller som bestanddel af præparater~~ i højere koncentrationer end 0,1 vægtprocent.
	4.	Senest den 11. september 2005 skal Kommissionen på baggrund af ny videnskabelig viden tage bestemmelserne om azofarvestoffer op til revision.

		↓ 2003/11/EF, artikel 1 (tilpasset) →1 Berigtigelse 2003/11/EF (EFT L 170 af 9.7.2003, s. 31)
→1 44. ← Pentabromderivat af diphenylether $C_{12}H_5Br_5O$	1.	Må ikke markedsføres eller anvendes ⌦ alene eller ⌫ som ~~stof eller som~~ bestanddel af

		~~stoffer eller~~ præparater i højere koncentrationer end 0,1 vægtprocent.
	2.	En ~~vare~~ ⌦ artikel ⌫ må ikke markedsføres, hvis den eller flammehæmmende dele af den indeholder dette stof i koncentrationer på over 0,1 vægtprocent.
→1 45. ← Octabromderivat af diphenylether $C_{12}H_2Br_8O$	1.	Må ikke markedsføres eller anvendes ⌦ alene eller ⌫ som ~~stof eller som~~ bestanddel af ~~stoffer eller~~ præparater i højere koncentrationer end 0,1 vægtprocent.
	2.	En ~~vare~~ ⌦ artikel ⌫ må ikke markedsføres, hvis den eller flammehæmmende dele af den indeholder dette stof i koncentrationer på over 0,1 vægtprocent.

	↓ 2003/53/EF, artikel 1 (tilpasset)
46. ~~1)~~ ⌦ a) ⌫ Nonylphenol $C_6H_4(OH)C_9H_{19}$ ~~2)~~ ⌦ b) ⌫ Nonylphenolethoxylat $(C_2H_4O)_nC_{15}H_{24}O$	Må ikke markedsføres eller anvendes alene eller som bestanddel af præparater i koncentrationer på eller over 0,1 vægtprocent til følgende formål: 1) erhvervsmæssig rensning, bortset fra: — kontrollerede lukkede systemer til kemisk rensning, hvor rensningsmidlet genvindes eller forbrændes — rensningssystemer, hvor rensningsmidlet genvindes eller forbrændes ved en særlig proces 2) rensning i private hjem 3) tekstil- og læderforarbejdning, bortset fra: — forarbejdning uden udledning af spildevand — systemer, hvor procesvandet forbehandles ved en særlig proces, der helt fjerner den organiske del forud for biologisk spildevandsbehandling (affedtning af fåreskind) 4) emulgator i pattedyp i landbruget 5) metalforarbejdning, bortset fra: — kontrollerede lukkede systemer, hvor rensningsmidlet genvindes eller forbrændes 6) fremstilling af papir og papirmasse 7) kosmetiske midler 8) andre midler til personlig pleje, bortset fra:

	— spermicider 9) hjælpestoffer i pesticider og biocider.
47. Cement	~~1)~~ ⌦ 1. ⌫ Cement og præparater, som indeholder cement, må ikke anvendes eller markedsføres, hvis de i hydreret form indeholder mere end 0,0002 % opløseligt chrom VI i forhold til den samlede tørvægt af cementen. ~~2)~~ ⌦ 2. ⌫ Hvis der anvendes reduktionsmidler, skal emballagen til cement og præparater, som indeholder cement, ~~med forbehold af~~ ⌦ medmindre andet er fastsat i ⌫ andre fællesskabsbestemmelser om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer og præparater, mærkes med klart læselige og uudslettelige oplysninger om emballeringsdato og om de lagerbetingelser og den lagringsperiode, der er hensigtsmæssige for at sikre, at reduktionsmidlet stadig er aktivt, og holde indholdet af opløseligt chrom VI under den grænse, der er anført i punkt 1. ~~3)~~ ⌦ 3. ⌫ Punkt 1 og 2 gælder dog ikke for markedsføring og anvendelse i forbindelse med kontrollerede lukkede og fuldautomatiserede processer, hvor cement og præparater, som indeholder cement, udelukkende behandles maskinelt, og hvor der ikke er nogen mulighed for kontakt med huden.

🡻 76/769/EØF (tilpasset)
➔1 97/64/EF, artikel 1
➔2 89/677/EØF, artikel 1, nr. 3
➔3 91/338/EØF, artikel 1
➔4 97/10/EF, artikel 1
➔5 96/55/EF, artikel 1
➔6 94/48/EF, artikel 1

➔1 [1] EFT L 196 af 16.8.1967, s. 1.
[2] ~~EFT L 110 af 4.5.1993, s. 20~~ ⌦ EFT L 225 af 21.8.2001, s. 1 ⌫ .
[3] ~~EFT L 248 af 30.9.1996, s. 1~~
[4] ⌦ EFT L 200 af 30.7.1999, s. 1. ⌫
[5] ⌦ EFT L 226 af 22.8.2001, s. 5. ⌫ 🡸
➔2 [6] ~~EFT L 96 af 3.4.1985, s. 25.~~ EFT L 350 af 28.12.1998, s. 58.
[7] EFT L 194 af 25.7.1975, s. 39. Direktivet ⌦ er senest ændret ved beslutning 96/350/EF (EFT L 135 af 6.6.1996, s. 32). ⌫
[8] ~~EFT L 84 af 31.3.1978, s. 43~~ ⌦ EFT L 377 af 31.12.1991, s. 20. Direktiv som ændret ved Rådets direktiv 94/31/EF (EFT L 168 af 2.7.1994, s. 28) ⌫ . 🡸
[9] Chrysotil har to CAS-numre, bekræftet af ECB.

➔3 [10] Rådets forordning (EØF) nr. 2658/87 af 23. juli 1987 om told- og statistiknomenklaturen og Den Fælles Toldtarif (EFT L 256 af 7.9.1987), senest ændret ved Kommissionens forordning nr. 2176/2002 (EFT L 331 af 7.12.2002, s. 3). ←

➔4 [11] EFT 196 af 16.8.1967, s. 1/67.

~~[12] EFT 196 af 16.8.1967, s. 1/67.~~

~~[13] EFT L 187 af 16.7.1988, s. 14~~.

[14] ~~EFT 22 af 9.2.1965, s. 369/65.~~ ⌦ EFT L 311 af 28.11.2001, s. 1. ⌫

[15] EFT L 311 af 28.11.2001, s. 67

[16] EFT L 262 af 27.9.1976, s. 169.

~~[17] EFT L 96 af 3.4.1985, s. 25.~~

~~[18] EFT L 187 af 16.7.1988, s. 14~~. ←

➔5 ~~[19] EFT 22 af 9.2.1965, s. 369/65.~~

~~[20] EFT L 214 af 24.8.1993, s. 22.~~

~~[21] EFT L 262 af 27.9.1976, s. 169.~~

~~[22] EFT L 151 af 23.6.1993, s. 32.~~ ←

➔6 [23] EFT L 147 af 9.6.1975, s. 40. Direktiv senest ændret ved Kommissionens direktiv 94/1/EF (EFT L 23 af 28.1.1994, s. 28) . ←

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

Tillæg ⌦ 1-6 ⌫

FORORD

Forklarende bemærkninger til spalternes overskrifter

Stoffets navn:

Navnet er det samme som det, der er anvendt for stoffet i bilag I til ⌦ Rådets ⌫ direktiv 67/548/EØF. Overalt, hvor det er muligt, er de farlige stoffer angivet med deres navne i EINECS (europæisk fortegnelse over markedsførte kemiske stoffer) eller ELINCS (europæisk liste over anmeldte kemiske stoffer). ⌦ Disse numre betegnes som EF-numre i tabellen. ⌫ Andre stoffer, som ikke er opført i EINECS eller ELINCS, er angivet med internationalt anerkendte kemiske betegnelser (f.eks. ISO eller IUPAC). Der er i visse tilfælde endvidere anført et trivialnavn.

Indeksnummer:

Indeksnummeret er den identifikationskode, som stoffet har fået i bilag I til direktiv 67/548/EØF. I tillægget er stofferne ordnet efter dette indeksnummer.

~~EF~~ ⌦ EINECS ⌫ -nummer:

I den europæiske fortegnelse over markedsførte kemiske stoffer (EINECS) er der fastlagt en identifikationskode for stoffet. Det laveste nummer er 200-001-8.

⌦ ELINCS-nummer: ⌫

For nye stoffer, som er anmeldt under direktiv 67/548/EØF er der fastlagt en identifikationskode, som er offentliggjort i den europæiske liste over anmeldte kemiske stoffer (ELINCS). Det laveste nummer er 400-010-9.

CAS-nummer:

Der er fastlagt CAS-numre (CAS = Chemical Abstract Service) for stoffer for at lette deres identifikation.

Noter:

Noternes fuldstændige tekst findes i forordet til bilag I til direktiv 67/548/EØF.

Noterne i ~~dette direktiv~~ ⌦ denne forordning ⌫ betyder følgende:

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

⌦ Note C: ⌫

⌦ Visse organiske stoffer markedsføres som klart definerbare isomerer eller som en blanding af flere isomerer. ⌫

⌦ Note D: ⌫

⌦ Visse stoffer, som har tilbøjelighed til spontan polymerisation eller nedbrydning, markedsføres almindeligvis i stabiliseret form. Det er i denne form, at de er opført i bilag I til direktiv 67/548/EØF. ⌫

⌦ I tilfælde, hvor disse stoffer markedsføres i ustabiliseret form, skal fabrikanten eller enhver anden, der markedsfører stoffet, angive stoffets navn på etiketten efterfulgt af angivelsen "ikke stabiliseret". ⌫

⌦ Note E : ⌫

⌦ Stoffer med særlige virkninger for sundheden (jf. kapitel 4 i bilag VI til direktiv 67/548/EØF), der klassificeres som kræftfremkaldende, mutagene og/eller reproduktionstoksiske i kategori 1 eller 2, mærkes med note E, hvis de også klassificeres som meget giftige (T+), giftige (T) eller sundhedsskadelige (Xn). For disse stoffer skal ordet "også" tilføjes før risikosætningerne R 20, R 21, R 22, R 23, R 24, R 25, R 26, R 27, R 28, R 39, R 68 (sundhedsskadelig), R 48 og R 65 og alle kombinationer af disse risikosætninger. ⌫

Note J:

Stoffet skal ikke nødvendigvis klassificeres som kræftfremkaldende, såfremt det kan påvises, at det indeholder mindre end 0,1 vægtprocent benzen (EINECS-nr. 200-753-7).

Note K:

Stoffet skal ikke nødvendigvis klassificeres som kræftfremkaldende, såfremt det kan påvises, at det indeholder mindre end 0,1 vægtprocent buta-1,3-dien (EINECS-nr. 200-450-8).

Note L:

Stoffet skal ikke nødvendigvis klassificeres som kræftfremkaldende, såfremt det kan påvises, at det indeholder mindre end 3 % DMSO-ekstrakt som målt ved IP 346.

Note M:

Stoffet skal ikke nødvendigvis klassificeres som kræftfremkaldende, såfremt det kan påvises, at det indeholder mindre end 0,005 vægtprocent benzo (def) chrysen (EINECS-nr. 200-028-5).

Note N:

Stoffet skal ikke nødvendigvis klassificeres som kræftfremkaldende, såfremt hele raffineringsforløbet kendes, og det kan påvises, at stoffet, hvoraf det er fremstillet, ikke er kræftfremkaldende.

Note P:

Stoffet skal ikke nødvendigvis klassificeres som kræftfremkaldende, såfremt det kan påvises, at det indeholder mindre end 0,1 vægtprocent benzen (EINECS-nr. 200-753-7).

↓ 2001/41/EF, artikel 1, nr. 1 (tilpasset)

Note R:

Kravet om klassificering som kræftfremkaldende skal ikke nødvendigvis gælde for fibre med en længdevægtet geometrisk middeldiameter minus to standardafvigelser på over 6 μm.

⌦ Note S: ⌫

⌦ Dette stof kræver ikke nødvendigvis nogen etiket i henhold til artikel 23 (jf. afdeling 8 i bilag VI) i direktiv 67/548/EØF. ⌫

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

⌦ Tillæg 1 ⌫

Punkt ~~29~~ ⌦ 28 ⌫ — Kræftfremkaldende stoffer: kategori 1

Stoffer	Indeksnummer	EF-nummer	CAS-nummer	Noter
Chromtrioxid; chrom(VI)oxid	024-001-00-0	215-607-8	1333-82-0	
Zinkchromater, herunder zinkkaliumchromat	024-007-00-3			
Nikkelmonoxid	028-003-00-2	215-215-7	1313-99-1	
Nikkeldioxid	028-004-00-8	234-823-3	12035-36-8	
Dinikkeltrioxid	028-005-00-3	215-217-8	1314-06-3	
Nikkelsulfid	028-006-00-9	240-841-2	16812-54-7	
Trinikkeldisulfid	028-007-00-4	234-829-6	12035-72-2	
Diarsentrioxid; arsentrioxid	033-003-00-0	215-481-4	1327-53-3	
Diarsenpentaoxid; arsenpentoxid	033-004-00-6	215-116-9	1303-28-2	
Arsensyre og dens salte	033-005-00-1			
Blyhydrogenarsenat	082-011-00-0	232-064-2	7784-40-9	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Butan (indhold ≥0,1 % butadien (203-450-8)) [1]	601-004-01-8	203-448-7 [1]	106-97-8 [1]	C, S
Isobutan (indhold ≥0,1 % butadien (203-450-8)) [2]		200-857-2 [2]	75-28-5 [2]	
1,3-Butadien; Buta-1,3-dien	601-013-00-X	203-450-8	106-99-0	D

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
Benzen	601-020-00-8	200-753-7	71-43-2	
Vinylchlorid; chlorethylen	602-023-00-7	200-831-0	75-01-4	
Bis(chlormethyl)ether; dichlordimethylether	603-046-00-5	208-832-8	542-88-1	
Chlormethylmethylether; chlordimethylether	603-075-00-3	203-480-1	107-30-2	
2-naphthylamin	612-022-00-3	202-080-4	91-59-8	
Benzidin; 4,4′-diaminobiphenyl	612-042-00-2	202-199-1	92-87-5	
Salte af benzidin	612-070-00-5			
Salte af 2-nafthylamin	612-071-00-0	⌦ 209-030-0[1] 210-313-6[2] ⌫	⌦ 553-00-4[1] 612-52-2[2] ⌫	
4-aminobiphenyl	612-072-00-6	202-177-1	92-67-1	
Salte af 4-aminobiphenyl	612-073-00-1			
Tjære, stenkuls-; stenkulstjære (Biproduktet fra tørdestillation af kul. Næsten sort, halvfast stof. En sammensat blanding af aromatiske carbonhydrider, phenolforbindelser, nitrogenbaser og thiophen).	648-081-00-7	232-361-7	8007-45-2	
Tjære, stenkuls-, højtemperaturs-; stenkulstjære (Kondensationsproduktet opnået ved at nedkøle, til omtrent omgivelsestemperatur, den gas, der udvikles ved tørdestillation af kul ved høj temperatur (højere end 700 °C). En sort, viskøs væske tungere end vand. Består primært af en sammensat blanding af kondenserede aromatiske carbonhydrider. Kan indeholde mindre mængder phenolforbindelser og aromatiske nitrogenbaser)	648-082-00-2	266-024-0	65996-89-6	

Tjære, stenkuls-, lavtemperaturs-; stenkulsolie (Kondensationsproduktet opnået ved at nedkøle, til omtrent omgivelsestemperatur, den gas, der udvikles ved tørdestillation af kul ved lav temperatur (lavere end 700 °C). En sort, viskøs væske tungere end vand. Sammensat primært af kondenserede aromatiske carbonhydrider, phenolforbindelser, aromatiske nitrogenbaser og deres alkylderivater)	648-083-00-8	266-025-6	65996-90-9	
Tjære, brunkuls-; (En olie destilleret fra brunkulstjære. Sammensat primært af aliphatiske, naphthenske og bi- til tricycliske aromatiske carbonhybrider, deres alkylderivater, heteroaromater og en- og toringede phenoler, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 360 °C)	648-145-00-4	309-885-0	101316-83-0	
Tjære, brunkuls-, lavtemperaturs-; (En tjære, opnået ved lavtemperatursforkulning og lavtemperatursforgasning af brunkul. Sammensat primært af aliphatiske, naphtenske og cycliske aromatiske carbonhydrider, heteroaromatiske carbonhydrider og cycliske phenoler)	648-146-00-X	309-886-6	101316-84-1	
Destillater (råolie), lette paraffin-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved vakuumdestillation af remanensen fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫ . Den indeholder en forholdsvis stor del mættede, aliphatiske, carbonhydrider normalt til stede i dette råoliedestillationsinterval)	649-050-00-0	265-051-5	64741-50-0	
Destillater (råolie), tunge paraffin-; uraffineret eller let raffineret baseolie	649-051-00-6	265-052-0	64741-51-1	

(En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved vakuumdestillation af remanensen fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder en forholdsvis stor del mættede, aliphatiske carbonhydrider)				
Destillater (råolie), lette naphthen-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved vakuumdestillation af remanensen, fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19eSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠ . Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-052-00-1	265-053-6	64741-52-2	
Destillater (råolie), tunge naphthen-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved vakuumdestillation af remanensen fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-053-00-7	265-054-1	64741-53-3	
Destillater (råolie), syrebehandlede tunge naphthen-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svovlsyrebehandlingsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19eSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder forholdsvis få	649-054-00-2	265-117-3	64742-18-3	

normalparaffiner)				
Destillater (råolie), syrebehandlede lette naphthen-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svovlsyrebehandlingsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eST ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-055-00-8	265-118-9	64742-19-4	
Destillater (råolie), syrebehandlede tunge paraffin-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svovlsyrebehandlingsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-056-00-3	265-119-4	64742-20-7	
Destillater (råolie), syrebehandlede lette paraffin-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svovlsyrebehandlingsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-057-00-9	265-121-5	64742-21-8	
Destillater (råolie), kemisk neutraliserede tunge paraffin-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en behandlingsproces til fjernelse af sure materialer. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en	649-058-00-4	265-127-8	64742-27-4	

viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder en forholdsvis stor del aliphatiske carbonhydrider)				
Destillater (råolie), kemisk neutraliserede lette paraffin-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en behandlingsproces til fjernelse af sure materialer. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-059-00-X	265-128-3	64742-28-5	
Destillater (råolie) kemisk neutraliserede tunge naphthen-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en behandlingsproces til fjernelse af sure materialer. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-060-00-5	265-135-1	64742-34-3	
Destillater (råolie), kemisk neutraliserede lette naphthen-; uraffineret eller let raffineret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en behandlingsproces til fjernelse af sure materialer. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30} og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-061-00-0	265-136-7	64742-35-4	
Erionit	650-012-00-0		12510-42-8	
Asbest	650-013-00-6		⌦ 12001-29-5	

			12001-28-4 ⌫ ~~132207-33-1~~ 132207-32-0 12172-73-5 77536-66-4 77536-68-6 77536-67-5	

⌦ Tillæg 2 ⌫

Punkt ~~29~~ ⌦ 28 ⌫ — Kræftfremkaldende stoffer: kategori 2

Stoffer	Indeksnummer	EF-nummer	CAS-nummer	Noter
Beryllium	004-001-00-7	231-150-7	7440-41-7	
Berylliumforbindelser med undtagelse af berylliumaluminiumsilicater	004-002-00-2			

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Berylliumoxid	004-003-00-8	215-133-1	1304-56-9	E

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

Sulfallat (ISO); 2-chlorallyldiethyldithiocarbamat	006-038-00-4	202-388-9	95-06-7	
Dimethylcarbamoylchlorid	006-041-00-0	201-208-6	79-44-7	
Diazomethan	006-068-00-8	206-382-7	334-88-3	
Hydrazin	007-008-00-3	206-114-9	302-01-2	
N,N-dimethylhydrazin	007-012-00-5	200-316-0	57-14-7	
1,2-dimethylhydrazin	007-013-00-0		540-73-8	
Salte af hydrazin	007-014-00-6			
Hydrazobenzen; 1,2-diphenylhydrazin	007-021-00-4	204-563-5	122-66-7	
Hydrazinbis(3-carboxy-4-hydroxybenzensulfonat)	007-022-00-X	405-030-1		
Hexamethylphosphortriamid	015-106-00-2	211-653-8	680-31-9	
Dimethylsulfat	016-023-00-4	201-058-1	77-78-1	

Diethylsulfat	016-027-00-6	200-589-6	64-67-5	
1,3-propansulton	016-032-00-3	214-317-9	1120-71-4	
Dimethylsulfamoylchlorid	016-033-00-9	236-412-4	13360-57-1	

↓ 1999/43/EF, artikel 1 (tilpasset)

Kaliumdichromat	024-002-00-6	231-906-6	7778-50-9	
Ammoniumdichromat	024-003-00-1	232-143-1	7789-09-5	
Natriumdichromat	024-004-00-7	234-190-3	10588-01-9	
Natriumdichromat, dihydrat	024-004-01-4	234-190-3	7789-12-0	
Chromyldichlorid	024-005-00-2	239-056-8	14977-61-8	
Kaliumchromat	024-006-00-8	232-140-5	7789-00-6	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

Calciumchromat	024-008-00-9	237-366-8	13765-19-0	
Strontiumchromat	024-009-00-4	232-142-6	7789-06-2	
Chrom(III)chromat; chromichromat; chrom(III)salt af Chrom (IV)syre	024-010-00-X	246-356-2	24613-89-6	

↓ 1999/43/EF, artikel 1

Chrom (VI) forbindelser, med undtagelse af bariumchromat samt sådanne nævnt andetsteds i bilag I til direktiv 67/548/EØF	024-017-00-8	—	—	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Natriumchromat	024-018-00-3	231-889-5	7775-11-3	E

		↓ 2003/34/EF, artikel 1		
Cobaltdichlorid	027-004-00-5	231-589-4	7646-79-9	
Cobaltsulfat	027-005-00-0	233-334-2	10124-43-3	

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
Kaliumbromat	035-003-00-6	231-829-8	7758-01-2	
Cadmiumoxid	048-002-00-0	215-146-2	1306-19-0	

		↓ 2003/34/EF, artikel 1		
Cadmiumfluorid	048-006-00-2	232-222-0	7790-79-6	

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
Cadmiumchlorid	048-008-00-3	233-296-7	10108-64-2	
Cadmiumsulfat	048-009-00-9	233-331-6	10124-36-4	
Benzo[a]pyren; benzo[d,e,f]chrysen	601-032-00-3	200-028-5	50-32-8	
Benzo[a]anthracen	601-033-00-9	200-280-6	56-55-3	
Benzo[b]fluoranthen; benzo[e]acephenanthrylen	601-034-00-4	205-911-9	205-99-2	
Benzo[j]fluoranthen	601-035-00-X	205-910-3	205-82-3	
Benzo[k]fluoranthen	601-036-00-5	205-916-6	207-08-9	
Dibenzo[a,h]anthracen	601-041-00-2	200-181-8	53-70-3	

		↓ 2003/34/EF, artikel 1		
Chrysen	601-048-00-0	205-923-4	218-01-9	
Benzo[*e*]pyren	601-049-00-6	205-892-7	192-97-2	

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
1,2-dibromethan; ethylendibromid	602-010-00-6	203-444-5	106-93-4	
1,2-dichlorethan; ethylendichlorid	602-012-00-7	203-458-1	107-06-2	
1,2-dibrom-3-chlorpropan	602-021-00-6	202-479-3	96-12-8	

		↓ 1999/43/EF, artikel 1		
Bromethylen; vinylbromid	602-024-00-2	209-800-6	593-60-2	

		↓ 2003/36/EF, artikel 1		
Trichlorethylen; trichlorethen	602-027-00-9	201-167-4	79-01-6	
αChlortoluen; benzylchlorid	602-037-00-3	202-853-6	100-44-7	E

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2		
α,α,α-trichlortoluen; trichlormethylbenzen	602-038-00-9	202-634-5	98-07-7	
1,3-dichlor-2-propanol	602-064-00-0	202-491-9	96-23-1	
Hexachlorbenzen	602-065-00-6	204-273-9	118-74-1	
1,4-dichlorbut-2-en	602-073-00-X	212-121-8	764-41-0	

		↓ 2003/36/EF, artikel 1		
2,3-dibrompropan-1-ol; 2,3-dibromo-1-propanol	602-088-00-1	202-480-9	96-13-9	E

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 →1 2003/36/EF, artikel 1		
Ethylenoxid; oxiran	603-023-00-X	200-849-9	75-21-8	
1-chlor-2,3-epoxypropan; epichlorhydrin	603-026-00-6	203-439-8	106-89-8	
Propylenoxid; 1,2-epoxypropan; methyloxiran	603-055-00-4	200-879-2	75-56-9	→1 E ←

		↓ 2003/34/EF, artikel 1		
2,2'-Bioxiran; 1,2:3,4-diepoxybutan	603-060-00-1	215-979-1	1464-53-5	
2,3-Epoxypropan-1-ol; glycidol	603-063-00-8	209-128-3	556-52-5	

		↓ 2003/36/EF, artikel 1		
Phenylglycidylether; 2,3-epoxypropyl-phenyl-ether; 1,2-epoxy-3-phenoxypropan	603-067-00-X	204-557-2	122-60-1	E

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2		
Styrenoxid; (epoxyethyl)benzen; phenyloxiran	603-084-00-2	202-476-7	96-09-3	

		↓ 2003/36/EF, artikel 1		
Furan	603-105-00-5	203-727-3	110-00-9	E
R2,3-Epoxy-1-propanol	603-143-00-2	404-660-4	57044-25-4	E
(R)-1-Chlor-2,3-epoxypropan	603-166-00-8	424-280-2	51594-55-9	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

4-amino-3-fluorphenol	604-028-00-X	402-230-0	399-95-1	

↓ 1999/43/EF, artikel 1

5-allyl-1,3-benzodioxol; safrol	605-020-00-9	202-345-4	94-59-7	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

3-propanolid; 1,3-propiolacton	606-031-00-1	200-340-1	57-57-8	
Urethan(INN); ethylcarbamat	607-149-00-6	200-123-1	51-79-6	
Methylacrylamidomethoxyacetat (der indeholder ≥ 0,1 % acrylamid)	607-190-00-X	401-890-7	77402-03-0	
Methylacrylamidoglycolat (der indeholder ≥ 0,1 % acrylamid)	607-210-00-7	403-230-3	77402-05-2	
Acrylonitril	608-003-00-4	203-466-5	107-13-1	
2-nitropropan	609-002-00-1	201-209-1	79-46-9	

↓ 2003/34/EF, artikel 1

2,4-Dinitrotoluen [1]; dinitrotoluen [2]; dinitrotoluen, teknisk	609-007-00-9	204-450-0 [1] 246-836-1 [2]	121-14-2 [1] 25321-14-6 [2]	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

5-nitroacenaphthen	609-037-00-2	210-025-0	602-87-9	
2-nitronaphtalen	609-038-00-8	209-474-5	581-89-5	
4-nitrobiphenyl	609-039-00-3	202-204-7	92-93-3	
Nitrofen (ISO); 2,4-dichlorphenyl-4-nitrophenylether	609-040-00-9	217-406-0	1836-75-5	

2-Nitroanisol	609-047-00-7	202-052-1	91-23-6	

↓ 2003/34/EF, artikel 1

2,6-Dinitrotoluen	609-049-00-8	210-106-0	606-20-2	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

2,3-Dinitrotoluen	609-050-00-3	210-013-5	602-01-7	E
3,4-Dinitrotoluen	609-051-00-9	210-222-1	610-39-9	E
3,5-Dinitrotoluen	609-052-00-4	210-566-2	618-85-9	E

↓ 2003/34/EF, artikel 1

Hydrazin-tri-nitromethan	609-053-00-X	414-850-9	—	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

2,5-Dinitrotoluen	609-055-00-0	210-581-4	619-15-8	E

↓ 2003/34/EF, artikel 1

Azobenzen	611-001-00-6	203-102-5	103-33-3	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

(Methyl-ONN-azoxy)methylacetat; (methylazoxymethyl)acetat	611-004-00-2	209-765-7	592-62-1	
Dinatrium-{5-[(4′-((2,6-dihydroxy-3-((2-hydroxy-5-	611-005-00-8	240-221-1	16071-86-6	

sulfophenyl)azo)phenyl)azo)(1,1′-biphenyl)-4-yl)azo]salicylato(4-)}cuprat(2-)				
4-o-tolylazo-o-toluidin; 4-amino-2′,3-dimethylazobenzen; fast garnet GBC base; AAT	611-006-00-3	202-591-2	97-56-3	
4-aminoazobenzen	611-008-00-4	200-453-6	60-09-3	

		↓ 1999/43/EF, artikel 1		
Benzidinbaserede azofarvestoffer; 4,4'-diarylazobiphenyl farvestoffer, undtagen sådanne nævnt andetsteds i bilag I til direktiv 67/548/EØF	611-024-00-1	—	—	
Dinatrium 4-amino 3-[[4′-[(2,4-diaminophenyl) azo][1,1′-biphenyl]-4-yl]azo]-5-hydroxy-6-(pehnylazo)-naphthalen-2, 7-disulfonat; C.I. Direct Black 38	611-025-00-7	217-710-3	1937-37-7	
Tetranatrium 3,3′-[[1,1′-biphenyl]-4,4′diylbis (azo)] bis [5-amino-4-hydroxynaphtahalenen-2,7-disulfonat]; C.I. Direct Blue 6	611-026-00-2	220-012-1	2602-46-2	
Dinatrium-3,3′-[[1,1′-biphenyl]-4,4′diylbis (azo)]bis[4-aminonaphthalene-1-sulfonat); C.I. Direct Red 28	611-027-00-8	209-358-4	573-58-0	

		↓ 2003/34/EF, artikel 1		
o-Dianisidin baserede azofarvestoffer; 4,4'-diarylazo-3,3'-dimethoxybiphenyl farvestoffer, undtagen sådanne nævnt andetsteds i bilag I til direktiv 67/548/EØF	611-029-00-9	—	—	
o-Toluidin baserede azofarvestoffer; 4,4'-diarylazo-3,3'-dimethylbiphenyl farvestoffer, undtagen sådanne nævnt andetsteds i bilag I til direktiv 67/548/EØF	611-030-00-4	—	—	

1,4,5,8-Tetraaminoanthraquinon; C.I. Disperse blue 1	611-032-00-5	219-603-7	2475-45-8	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

6-Hydroxy-1-(3-isopropoxypropyl)-4-methyl-2-oxo-5-[4-(phenylazo)phenylazo]-1,2-dihydro-3-pyridinecarbonitril	611-057-00-1	400-340-3	85136-74-9	
(6-(4-Hydroxy-3-(2-methoxyphenylazo)-2-sulfonato-7-naphthylamino)-1,3,5-triazin-2,4-diyl)bis[(amino-1-methylethyl)-ammonium] format	611-058-00-7	402-060-7	108225-03-2	
Trinatrium-[4'-(8-acetylamino-3,6-disulfonato-2-naphthylazo)-4"-(6-benzoylamino-3-sulfonato-2-naphthylazo)biphenyl-1,3',3",1'"-tetraolato-O, O', O", O'"]kobber(II)	611-063-00-4	413-590-3	—	
Phenylhydrazin [1] Phenylhydraziniumchlorid [2] Phenylhydrazin-hydrochlorid [3] Phenylhydraziniumsulfat (2:1) [4]	612-023-00-9	202-873-5 [1] 200-444-7 [2] 248-259-0 [3] 257-622-2 [4]	100-63-0 [1] 59-88-1 [2] 27140-08-5 [3] 52033-74-6 [4]	E

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

2-methoxyanilin; ortho-anisidin	612-035-00-4	201-963-1~~(o)~~	90-04-0	
3,3′-dimethoxybenzidin; o-dianisidin	612-036-00-X	204-355-4	119-90-4	
salte af 3,3′-dimethoxybenzidin; salte af o-dianisidin	612-037-00-5			

3,3′-dimethylbenzidin; o-tolidin	612-041-00-7	204-358-0	119-93-7	
4,4′-diaminodiphenylmethan	612-051-00-1	202-974-4	101-77-9	
3,3′-dichlorbenzidin	612-068-00-4	202-109-0	91-94-1	
salte af 3,3′-dichlorbenzidin	612-069-00-X	⌦ 210-323-0[1] 265-293-1[2] 277-822-3[3] ⌫	⌦ 612-83-9[1] 64969-34-2[2] 74332-73-3[3] ⌫	
Dimethylnitrosamin; N-nitrosodimethylamin	612-077-00-3	200-549-8	62-75-9	
2,2′-dichlor-4,4′-methylendianilin; 4,4′-methylenbis(2-chloranilin)	612-078-00-9	202-918-9	101-14-4	
Salte af 2,2′-dichlor-4,4′-methylendianilin; salte af 4,4′-methylenbis(2-chloranilin)	612-079-00-4			
salte af 3,3′-dimethylbenzidin	612-081-00-5	⌦ 210-322-5[1] 265-294-7[2] 277-985-0[3] ⌫	⌦ 612-82-8[1] 64969-36-4[2] 74753-18-7[3] ⌫	
1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin	612-083-00-6	200-730-1	70-25-7	
4,4′-methylendi-o-toluidin	612-085-00-7	212-658-8	838-88-0	
2,2′-(nitrosoimino)bisethanol	612-090-00-4	214-237-4	1116-54-7	
o-Toluidin	612-091-00-X	202-429-0	95-53-4	

Nitrosodipropylamin	612-098-00-8	210-698-0	621-64-7	
4-methyl-m-phenylendiamin	612-099-00-3	202-453-1	95-80-7	

↓ 1999/43/EF, artikel 1

Toluen-2,4-diammoniumsulfat	612-126-00-9	265-697-8	65321-67-7	

↓ 2001/41/EF, artikel 1, nr. 2

4-chloranilin	612-137-00-9	203-401-0	106-47-8	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

Ethylenimin; aziridin	613-001-00-1	205-793-9	151-56-4	
2-methylaziridin; propylenimin	613-033-00-6	200-878-7	75-55-8	
Captafol (ISO); 1,2,3,6-tetrahydro-N-(1,1,2,2-tetrachlorethylthio)phthalimid	613-046-00-7	219-363-3	2425-06-1	
Carbadox (INN); methyl-3-(quinoxalin-2-ylmethylen)carbazat-1,4-dioxid; 2-(methoxycarbonylhydrazonomethyl)quinoxalin-1,4-dioxid	613-050-00-9	229-879-0	6804-07-5	
Acrylamid	616-003-00-0	201-173-7	79-06-1	
Thioacetamid	616-026-00-6	200-541-4	62-55-5	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Blanding af: N-[3-hydroxy-2-(2-methylacryloylamino-methoxy)-propoxymethyl]-2-methyl-acrylamid; N-[2,3-bis-(2-methylacryloylaminomethoxy)propoxymethyl]-2-methylacrylamid; methacrylamid; 2-methyl-N-(2-methylacryloylamino-methoxy-methyl)-acrylamid; N-(2,3-dihydroxy-	616-057-00-5	412-790-8	—	

propoxymethyl)-2-methyl-acrylamid				

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
Destilar (stenkulstjære), benzenfraktion; letolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af stenkulstjære. Den består af carbonhydrider, primært C_4 til C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 80 °C til 160 °C)	648-001-00-0	283-482-7	84650-02-2	
Tjæreolier, brunkuls-; letolie (Destillatet fra brunkulstjære, med kogeinterval omtrent fra 80 °C til 250 °C. Sammensat primært af aliphatiske og aromatiske carbonhydrider og monobasiske phenoler)	648-002-00-6	302-674-4	94114-40-6	J
Benzenforløb (kul); redestilleret letolie, lavtkogende (Destillat fra koksovnsletolie med et omtrentligt destillationsinterval under 100 °C. Sammensat primært af aliphatiske C_4 til C_6 carbonhydrider)	648-003-00-1	266-023-5	65996-88-5	J
Destillater (stenkulstjære), benzenfraktion, benzen-, toluen- og xylenrige; redestilleret letolie, lavtkogende (En rest fra destillationen af rå benzen til fjernelse af de første benzendestillationsprodukter. Sammensat primært af benzen, toluen og xylen, med kogeinterval omtrent fra 75 °C til 200 °C)	648-004-00-7	309-984-9	101896-26-8	J
Aromatiske carbonhydrider, $C_{6\text{-}10}$-, C_8-rige; redestilleret letolie, lavtkogende	648-005-00-2	292-697-5	90989-41-6	J
Mineralsk terpentin (kul), let; redestilleret letolie, lavtkogende	648-006-00-8	287-498-5	85536-17-0	J

Solventnaphtha (kul), xylen-styrenfraktion; redestilleret letolie, mellemdestillat	648-007-00-3	287-502-5	85536-20-5	J
Mineralsk terpentin (kul), coumaron-styrenholdigt; redestilleret letolie, mellemdestillat	648-008-00-9	287-500-4	85536-19-2	J
Naphtha (kul), destillationsrester; redestilleret letolie, højtkogende (Resten tilbageblevet ved destillation af genvundet naphtha. Sammensat primært af naphthalen og kondensationsprodukter af inden og styren)	648-009-00-4	292-636-2	90641-12-6	J
Aromatiske carbonhydrider, C_{8-}; redestilleret letolie, højtkogende	648-010-00-X	292-694-9	90989-38-1	J
Aromatiske carbonhydrider, C_{8-9}-; biprodukter fra carbonhydridharpikspolymerisation; redestilleret letolie, højtkogende (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved afdampning af solvent, under vakuum, fra polymeriseret carbonhydridharpiks. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider; overvejende C_8 til og med C_9, med kogeinterval omtrent fra 120 °C til 215 °C)	648-012-00-0	295-281-1	91995-20-9	J
Aromatiske carbonhydrider, C_{9-12-}; benzendestillation; redestilleret letolie, højtkogende	648-013-00-6	295-551-9	92062-36-7	J
Ekstraktionsrester (kul), alkalisk benzenfraktion, syreekstrakt; syrefri letolie, lavtkogende (Redestillatet fra destillatet, befriet for tjæresyrer og tjærebaser, fra højtemperaturstjære fra bituminøse kul, med kogeinterval omtrent fra 90 °C til 160 °C. Det består overvejende af benzen, toluen og xylener)	648-014-00-1	295-323-9	91995-61-8	J
Ekstraktionsrester (stenkulstjære), benzolfraktion alkaliske, syreekstrakt;	648-015-00-7	309-868-8	101316-63-6	J

syrefri letolie, lavtkogende (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved redestillationen af destillatet af højtemperatursstenkulstjære (tjæresyre- og tjærebasefri). Den består overvejende af usubstituerede og substituerede monocycliske, aromatiske carbonhydrider kogende i området 85 °C-195 °C)				
Ekstraktionsrester (kul), benzenfraktion, syre-; syrefri letolie, lavtkogende (Et syreslamsbiprodukt fra svovlsyreraffineringen af rå højtemperaturskul. Sammensat primært af svovlsyre og organiske forbindelser)	648-016-00-2	298-725-2	93821-38-6	J
Ekstraktionsrester (kul), letolie alkaliske, destillationstopfraktioner; syrefri letolie, lavtkogende (Den første fraktion fra destillation af aromatiske carbonhydrider, courmaron-, naphthalen- og indenrige præfraktionskolonnebundfraktioner eller vasket carbololie, kogende væsentligt under 145 °C. Sammensat primært af C_{7-} og C_8 aliphatisk og aromatiske carbonhydrider)	648-017-00-8	292-625-2	90641-02-4	J
Ekstraktionsrester (kul), letolie-alkaliske, syreekstrakt, indenfraktion; syrefri letolie, mellemdestillat	648-018-00-3	309-867-2	101316-62-5	J
Ekstraktionsrester (kul), letolie alkaliske, indennaphthafraktion; syrefri letolie, højtkogende (Destillatet fra aromatiske carbonhydrider, coumaron-, naphthalen- og indenrige præfraktioneringskolonnebundfraktioner eller vasket carbololie med kogeinterval omtrent fra 155 °C til 180 °C. Sammensat primært af inden, indan og trimethylbenzener)	648-019-00-9	292-626-8	90641-03-5	J
Solventnaphtha (kul); syrefri letolie,	648-020-00-4	266-013-0	65996-79-4	J

højtkogende (Destillat, fra enten højtemperatursstenkulstjære, koksovnsletolie eller alkalisk ekstraktionsrest af stenkulstjæreolie, med et omtrentligt destillationsinterval fra 130 °C til 210 °C. Sammensat primært af inden og andre polycycliske ringsystemer indeholdende en enkelt aromatisk ring. Kan indeholde phenolforbindelser og aromatiske nitrogenbaser)				
Destillater (stenkulstjære), letoiler, neutral fraktion; syrefri letolie, højtkogende (Et destillat fra den fraktionerede destillation af højtemperatursstenkulstjære. Sammensat primært af alkylsubstituerede, monocycliske, aromatisk carbonhydrider, med kogeinterval omtrent fra 135 °C til 210 °C. Kan også indeholde umættede carbonhydrider såsom inden og coumaron)	648-021-00-X	309-971-8	101794-90-5	J
Destillater (stenkulstjære), lette olier, syreekstrakter; syrefri letolie, højtkogende (Denne olie er en sammensat blanding af aromatiske carbonhydrider, primært inden, naphthalen, coumaron, phenol og o-, m- og p-cresol, med kogeinterval fra 140 °C til 215 °C)	648-022-00-5	292-609-5	90640-87-2	J
Destillater (stenkulstjære), lette olier, karbololie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af stenkulstjære. Den består af aromater og andre carbonhydrider, phenolforbindelser og aromatiske nitrogenforbindelser og med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 210 °C)	648-023-00-0	283-483-2	84650-03-3	J
Tjæreolier, stenkuls-; karbololie	648-024-00-6	266-016-7	65996-82-9	J

(Destillat fra højtemperatursstenkulstjære med et omtrentligt destillationsinterval fra 130 °C til 250 °C. Sammensat primært af naphthalen, alkylnaphthalener, phenolforbindelser og aromatiske nitrogenbaser)				
Ekstraktionsrester (kul), letolie alkaliske, syreekstrakt; syrefri karbololie (Olien fremkommet ved syrevask, af alkalivasket carbololie, for at fjerne mindre mængder af basiske forbindelser (tjærebaser). Sammensat primært af inden, indan og alkylbenzener)	648-026-00-7	292-624-7	90641-01-3	J
Ekstraktionsrester (kul), tjæreolie alkaliske; syrefri karbololie (Rest opnået fra stenkulstjæreolie ved en alkalisk vask, såsom vandig natriumhydroxid, efter fjernelsen af råstenkulstjæresyrer. Sammensat primært af naphthalener og aromatiske nitrogenbaser)	648-027-00-2	266-021-4	65996-87-4	J
Ekstraktionsolier (stenkul), letolier; syreekstrakt (Det vandige ekstrakt fremstillet ved sur vask af alkalivasket carbololie. Sammensat primært af syresalte af forskellige aromatiske nitrogenbaser, inklusive pyridin, quinolin og deres alkylderivater)	648-028-00-8	292-622-6	90640-99-6	J
Pyridin, alkylderivater; råtjærebaser (Den sammensatte blanding af polyalkylerede pyridiner opnået ved stenkulstjæredestillation eller som højtkogende destillater, omtrent højere end 150 °C, fra reaktion mellem ammoniak og acetaldehyd, formaldehyd eller paraformaldehyd)	648-029-00-3	269-929-9	68391-11-7	J
Tjærebaser, stenkuls-, picolinfraktion; basedestillater	648-030-00-9	295-548-2	92062-33-4	J

(Pyridinbaser, med kogeinterval omtrent fra 125 °C til 160 °C, opnået ved destillation af et neutraliseret syreekstrakt fra den baseholdige tjærefraktion, opnået ved destillationen af bituminøs stenkulstjære. Sammensat hovedsageligt af lutidiner og picoliner)				
Tjærebaser, stenkuls-, lutidinfraktion; basedestillater	648-031-00-4	293-766-2	91082-52-9	J
Ekstraktionsolier (kul), tjærebase-, collidinfraktion; basedestillater (Ekstraktet fremstillet ved den sure ekstraktion af baser fra aromatiske olier fra rå kultjære, neutralisation, og destillation af baserne. Sammensat primært af collidiner, anilin, toluidiner, lutidiner og xylidiner)	648-032-00-X	273-077-3	68937-63-3	J
Tjærebaser, stenkuls-, collidinfraktion; basedestillater (Destillationsfraktionen, med kogeinterval omtrent fra 181 °C til 186 °C, fra råbaserne, opnået fra den neutraliserede, syreekstraherede, baseholdige tjærefraktion, opnået ved destillationen af bituminøs stenkulstjære. Den indeholder hovedsageligt anilin og collidiner)	648-033-00-5	295-543-5	92062-28-7	J
Tjærebaser, stenkuls-, anilinfraktion; basedestillater (Destillationsfraktionen, med kogeinterval omtrent fra 180 °C til 200 °C, fra råbaser opnået ved at afphenolere og afbase den carbolerede olie fra destillationen af stenkulstjære. Den indeholder hovedsageligt anilin, collidiner, lutidiner og toluidiner)	648-034-00-0	295-541-4	92062-27-6	J
Tjærebaser, stenkuls-, toluidinfraktion; basedestillater	648-035-00-6	293-767-8	91082-53-0	J
Destillater (råolie), alken-alkyn-fabrikations-pyrolyseolie, blandet med højtemperatursstenkulstjære, indenfraktion; redestillater	648-036-00-1	295-292-1	91995-31-2	J

(En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et redestillat fra den fraktionerede destillation af højtemperaturstjære fra bituminøse kul, og restolier, der er opnået fra den pyrolytiske fremstilling af alkener og alkyner ud fra råolieprodukter eller naturgas. Den består overvejende af inden, og har kogeinterval omtrent fra 160 °C til 190 °C)				
Destillater (kul), stenkulstjære-restpyrolyseolier, naphthalenolier; redestillater (Redestillatet, opnået fra den fraktionerede destillation af højtemperaturstjære fra bituminøse kul og pyrolyserestolier, med kogeinterval omtrent fra 190 °C til 270 °C. Sammensamt primært af substituerede bicycliske aromater)	648-037-00-7	295-295-8	91995-35-6	J
Ekstraktionsrester (kul), stenkulstjære og restpyrolyseolier, naphthalenolie, restdestillater; redestillater (Redestillatet fra den fraktionerede destillation af afphenoleret og afbaset methylnaphthalenolie opnået fra højtemperaturstjære fra bituminøse kul og restpyrolyseolier, med kogeinterval omtrent fra 220 °C til 230 °C. Det består overvejende af usubstituerede og substituerede, bicycliske, aromatiske, carbonhydrider)	648-038-00-2	295-329-1	91995-66-3	J
Ekstraktionsolier (stenkul), stenkulstjære rest-pyrolyseolier, naphthalenolier; redestillater (En neutral olie opnået ved fjernelse af base og phenol fra olien opnået ved destillationen af højtemperaturstjære og pyrolyserestolier, med kogeinterval fra 225 °C til 255 °C. Sammensat primært af substituerede, toleddede, aromatiske carbonhydrider)	648-039-00-8	310-170-0	122070-79-5	J
Ekstraktionsolier (stenkul),	648-040-00-3	310-171-6	122070-80-8	J

stenkulstjære rest-pyrolyseolier, naphthalenolie, destillationsrester; redestillater (Rest fra destillationen af methylnaphthalenolie (fra bituminøs stenkulstjære og pyrolyserestolier), der er befriet for phenol og base, med et kogeinterval fra 240 °C til 260 °C. Sammensat primært af substituerede toleddede, aromatiske og heterocycliske carbonhydrider)				
Absorptionsolier, bicycliske aromater og heterocyclisk carbonhydridfraktion; redestilleret vaskeolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et redestillat fra destillationen af vaskeolie. Den består overvejende af 2-ringede aromatiske og heterocycliske carbonhydrider, med kogeinterval fra 260 °C til 290 °C)	648-041-00-9	309-851-5	101316-45-4	M
Destillater (stenkulstjære), øvre, fluorenrige; redestilleret vaskeolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved krystallisationen af tjæreolie. Den består af aromatiske og polycycliske carbonhydrider, primært fluoren og noget acenaphthen)	648-042-00-4	284-900-0	84989-11-7	M
Creosotolie, acenaphthenfraktion, acenaphthenfri; redestilleret vaskeolie (Den tiloversblevne olie efter fjernelse, ved en krystallisationsproces, af acenaphthen fra acenaphthenolie fra stenkulstjære. Sammensat primært af naphthalen og alkylnaphthalener)	648-043-00-X	292-606-9	90640-85-0	M
Destillater (stenkulstjære), tunge olier; tung antracenolie (Destillater, fra fraktioneret destillation af stenkulstjære fra bituminøse kul, med kogeinterval omtrent fra 240 °C til 400 °C. Sammensat primært af tri- og polycycliske, carbonhydrider og	648-044-00-5	292-607-4	90640-86-1	

heterocycliske forbindelser)				
Antracenolie, syreekstrakt; basefri antracenolie (En sammensat blanding af carbonhydrider, fra den basebefriede fraktion opnået fra destillationen af stenkulstjære, med kogeinterval omtrent fra 325 °C til 365 °C. Den indeholder overvejende anthracen og phenanthren og deres alkylderivater)	648-046-00-6	295-274-3	91995-14-1	M
Destillater (stenkulstjære); tung antracenolie (Destillatet fra stenkulstjære med et omtrentligt destillationsinterval fra 100 °C til 450 °C. Sammensat primært af aromatiske carbonhydrider, bestående af to- til firleddede kondenserede ringe, phenolforbindelser og aromatiske nitrogenbaser)	648-047-00-1	266-027-7	65996-92-1	M
Destillater (stenkulstjære), beg-, tunge olier; tung antracenolie (Destillatet fra destillationen af begen opnået fra bituminøs højtemperaturstjære. Sammensat primært af tri- og polycycliske aromatiske carbonhydrider, med kogeinterval omtrent fra 300 °C til 470 °C. Produktet kan også indeholde heteroatomer)	648-048-00-7	295-312-9	91995-51-6	M
Destillater (kultjære) beg; tung antracenolie (Olien opnået ved kondensering af dampene fra varmbehandlingen af beg. Sammensat primært af to- til firringede aromatiske forbindelser, med kogeinterval omtrent fra 200 °C til mere end 400 °C)	648-049-00-2	309-855-7	101316-49-8	M
Destillater (stenkulstjære), tunge olier, pyrenfraktion; redestilleret tung antracenolie (Redestillatet, opnået fra fraktioneret destillation af begdestillat, med	648-050-00-8	295-304-5	91995-42-5	M

kogeinterval omtrent fra 350 °C til 400 °C. Består overvejende af tri- og polycycliske aromater og heterocycliske carbonhydrider)				
Destillater (stenkulstjære), beg-, pyrenfraktion; redestilleret tung antracenolie (Redestillatet, opnået fra fraktioneret destillation af begdestillat, med kogeinterval omtrent fra 380 °C til 410 °C. Sammensat primært af tri- og polycycliske aromatiske carbonhydrider og heterocycliske forbindelser)	648-051-00-3	295-313-4	91995-52-7	M
Paraffinvokser (kul), brunkulhøjtemperaturstjære, carbonbehandlet; syre- og basefri kultjære (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af brunkul-forkulningstjære med aktivt kul for at fjerne sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	648-052-00-9	308-296-6	97926-76-6	M
Paraffinvokser (kul), brunkulhøjtemperaturstjære, lerbehandlet; syre- og basefri kultjære (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af brunkul-forkulningstjære med bentonit for at fjerne sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	648-053-00-4	308-297-1	97926-77-7	M
Beg; tjærebeg	648-054-00-X	263-072-4	61789-60-4	M
Beg, kultjære-, højtemperaturs-; tjærebeg (Resten fra destillationen af	648-055-00-5	266-028-2	65996-93-2	

højtemperatursstenkulstjære. Et sort, fast stof med et blødgøringspunkt omtrent fra 30 °C til 180 °C. Består primært af en sammensat blanding af aromatiske carbonhydrider, bestående af tre- eller flerleddede kondenserede ringe)				
Beg, kultjære, højtemperatur, varmebehandlet; tjærebeg (Den varmebehandlede rest fra destillationen af højtemperaturstenkulstjære. Et sort, fast stof med et blødgøringspunkt omtrent fra 80 °C til 180 °C. Sammensat primært af en kompleks blanding af tre- eller flerleddede, kondenserede, aromatiske carbonhydrider)	648-056-00-0	310-162-7	121575-60-8	M
Beg, kultjære-, højtemperaturs, sekundær; redestilleret tjærebeg (Resten opnået under destillationen af højtkogende fraktioner fra højtemperaturstjære fra bituminøse kul og/eller begkoksolie, med et blødgøringspunkt fra 140 °C til 170 °C ifølge DIN 52025. Sammensat primært af tri- og polycycliske, aromatiske forbindelser, som også indeholder heteroatomer)	648-057-00-6	302-650-3	94114-13-3	M
Rester (stenkulstjære), begdestillations-; redestilleret tjærebeg (Rest fra den fraktionerede destillation af begdestillat med kogeinterval omtrent fra 400 °C til 470 °C. Sammensat primært af polycycliske, aromatiske carbonhydrider og heterocycliske forbindelser)	648-058-00-1	295-507-9	92061-94-4	M
Tjære, stenkuls-, højtemperatur, destillations- og oplageringsrester; kultjæresediment (Koks- og askeholdige, faste rester, der adskilles ved destillation og termisk behandling af højtemperaturstjære fra bituminøse kul i destillationsinstallationer og	648-059-00-7	295-535-1	92062-20-9	M

oplageringsbeholdere. Består overvejende af carbon, og indeholder små mængder af heteroforbindelser, såvel som askekomponenter)				
Tjære, stenkuls-, lagerrester; kultjæresediment (Aflejringer, fjernet fra lagre af rå stenkulstjære. Består primært af stenkulstjære og kulholdigt, findelt stof)	648-060-00-2	293-764-1	91082-50-7	M
Tjære, stenkuls-, højtemperaturs-, rester; kultjæresediment (Faste stoffer dannet under forkoksningen af bituminøse kul for at fremstille rå højtemperaturstjære. Sammensat primært af koks- og kulpartikler, højt aromatiserede forbindelser og mineralske stoffer)	648-061-00-8	309-726-5	100684-51-3	M
Tjære, stenkuls-, højtemperatur, højt indhold af faste stoffer; kultjæresediment (Kondensationsproduktet opnået ved køling, omtrent til omgivende temperatur, af gassen udviklet ved højtemperaturstørdestillationen (højere end 700 °C) af kul. Består primært af en sammensat blanding af kondenserede aromatiske carbonhydrider med et højt faststof indhold af kul- og koks-lignende materialer)	648-062-00-3	273-615-7	68990-61-4	M
Affaldsstoffer, faste, kultjærebegsforkoksnings-; kultjæresediment (Det samlede affald dannet ved forkoksningen af bituminøs kultjærebeg. Der består overvejende af carbon)	648-063-00-9	295-549-8	92062-34-5	M
Ekstraktrester (kul), brunkul; syre- og basefri kultjære (Resten fra toluenekstraktion af tørret brunkul)	648-064-00-4	294-285-0	91697-23-3	M

Paraffinvokser (kul), brunkulshøjtemperaturstjære; syre- og basefri kultjære (En sammensat blanding af carbonhydrider, opnået fra brunkulsforkulningstjære ved solventkrystallisation (solventafoliering), ved svedning eller en adduktionsproces. Den består overvejende af ligekædede og forgrenede, mættede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	648-065-00-X	295-454-1	92045-71-1	M
Paraffinvokser (kul), brunkulshøjtemperaturstjære, hydrogenbehandlede; syre- og basefri kultjære (En sammensat blanding af carbonhydrider, opnået fra brunkulsforkulningstjære ved solventkrystallisation (solventafoliering), ved svedning eller en adduktionsproces, behandlet med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overejende af ligekædede og forgrenede, mættede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	648-066-00-5	295-455-7	92045-72-2	M
Paraffinvokser (kul), brunkulshøjtemperaturstjære, kiselsyrebehandlet; syre- og basefri kultjære (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af brunkul-forkulningstjære med kiselsyre for af fjerne sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af ligekædede og forgrenede mættede carbonhydrider, overvejende støre end C_{12})	648-067-00-0	308-298-7	97926-78-8	M
Tjære, stenkuls-, lavtemperatur, destillationsrester; kultjæreolie, mellemdestillat (Rester fra fraktioneret destillation af lavtemperaturstenkulstjære for at fjerne	648-068-00-6	309-887-1	101316-85-2	M

olier, der koger i området op til omtrent 300 °C. Sammensat primært af aromatiske forbindelser)				
Beg, kultjære, lavtemperaur; tjærebeg (Et sammensat sort, fast, eller halvfast stof opnået ved destillation af en lavtemperaturstenkulstjære. Det har et blødgøringspunkt mellem omtrent 40 °C og 180 °C. Sammensat primært af en kompleks blanding af carbonhydrider)	648-069-00-1	292-651-4	90669-57-1	M
Beg, kultjære, lavtemperatur, oxideret; tjærebeg, oxideret (Produktet opnået ved at luftgennemblæse lavtemperaturkultjærebeg ved forhøjet temperatur. Det har et blødgøringspunkt mellem omtrent 70 °C og 180 °C. Sammensat primært af en kompleks blanding af carbonhydrider)	648-070-00-7	292-654-0	90669-59-3	M
Beg, kultjære-, lavtemperatur, varmebehandlet; tjærebeg, oxideret; tjærebeg, varmebehandlet (Et sammensat sort, fast, stof opnået ved varmebehandling af lavtemperaturkultjærebeg. Det har et blødgøringspunkt mellem omtrent 50 °C og 140 °C. Sammensat primært af en kompleks blanding af aromatiske forbindelser)	648-071-00-2	292-653-5	90669-58-2	M
Destillater (kul og råolie), kondenserede aromat-; destillater (Destillatet fra en blandning af stenkulstjære og aromatiske råoliestrømme med destillationsområde omtrent fra 220 °C til 450 °C. Sammensat primært af aromatiske carbonhydrider, bestående af 3- til 4-leddede kondenserede ringe)	648-072-00-8	269-159-3	68188-48-7	M
Aromatiske carbonhydrider, C_{20-28-}, polycycliske, blandet kultjærebeg, polyethylen og polypropylen, pyrolyseafledte; pyrolyseprodukter	648-073-00-3	309-956-6	101794-74-5	M

(En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved pyrolyse af blandet kultjærebeg, polyethylen og polypropylen. Sammensat primært af polycycliske, aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{28}, med et blødgøringspunkt fra 100 °C til 220 °C ifølge DIN 52025)				
Aromatiske carbonhydrider, C_{20-28-}, polycycliske, blandet kultjærebeg og polyethylen, pyrolyseafledte; pyrolyseprodukter (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved pyrolyse af blandet kultjærebeg og polyethylen. Sammensat primært af polycycliske, aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{28}, med et blødgøringspunkt fra 100 °C til 220 °C ifølge DIN 52025)	648-074-00-9	309-957-1	101794-75-6	M
Aromatiske carbonhydrider, C_{20-28-}, polycycliske, blandet kultjærebeg og polystyren, pyrolyseafledte; pyrolyseprodukter (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved pyrolyse af blandet kultjærebeg og polystyren. Sammensat primært af polycycliske, aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{28}, med et blødgøringspunkt fra 100 °C til 220 °C ifølge DIN 52025)	648-075-00-4	309-958-7	101794-76-7	M
Beg, kultjære- og råolie-; tjærebeg (Remanensen fra destillationen af en blanding af stenkulstjære og aromatiske råoliestrømme. Et fast stof med et blødgøringspunkt fra 40 °C til 180 °C. Sammensat primært af en kompleks blanding af aromatiske carbonhydrider, bestående af tre- eller flerleddede kondenserede ringe)	648-076-00-X	269-109-0	68187-57-5	M
Phenanthren, destillationsrester; redestilleret tung antracenolie (Rest, fra destillationen af rå	648-077-00-5	310-169-5	122070-78-4	M

phenanthren, kogende i området omtrent fra 340 °C til 420 °C. Den består overvejende af phenanthren, anthracen og carbazol)				
Destillater (stenkulstjære), øvre, fluorenfri; redestilleret vaskeolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved krystallisationen af tjæreolie. Den består af aromatiske, polycykliske carbonhydrider, primært diphenyl, dibenzofuran og acenaphthen)	648-078-00-0	284-899-7	84989-10-6	M
Rester (stenkulstjære), creosotolie detillations-; redestilleret vaskeolie (Resten, fra fraktioneret destillation af vaskeolie, med kogeinterval omtrent fra 270 °C til 330 °C. Den består overvejende af bicycliske aromatiske og heterocycliske carbonhydrider)	648-080-00-1	295-506-3	92061-93-3	M
Destillater (kul), koksovns-letolie, naphthalenfraktion; naftalinolie (Den sammensatte blanding af carbonhydrider opnået ved prefraktionering (kontinuerlig destillation) af koksovnsletolie. Den består overvejende af naphtalen, coumaron og inden og koger højere end 148 °C)	648-084-00-3	285-076-5	85029-51-2	J, M
Destillater (stenkulstjære), naphthalenolier, med lavt indhold af naphthalen; redestilleret naftalinolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved krystallisation af naphthalenolie. Sammensat primært af naphthalen, alkylnaphthalen og phenolforbindelser)	648-086-00-4	284-898-1	84989-09-3	J, M
Destillater (stenkulstjære), naphthalenolie-krystallisationsmoderlud; redestilleret naftalinolie (En sammensat blanding af organiske forbindelser, opnået som et filtrat fra	648-087-00-X	295-310-8	91995-49-2	J, M

krystallisationen af naphthalenfraktionen fra stenkulstjære, med kogeinterval omtrent fra 200 °C til 230 °C. Indeholder hovedsageligt naphthalen, thionaphthalen og alkylnaphthalener)				
Ekstraktionsrester (stenkul), naphthalenolie, alkaliske; syrefri naftalinolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved den alkaliske vask af naphthalenolie for at fjerne phenolforbindelser (tjæresyrer). Den består af naphthalen og alkylnaphthalen)	648-088-00-5	310-166-9	121620-47-1	J, M
Ekstraktionsrester (stenkul), naphthalenolie, alkaliske, med lavt indhold af naphthalen; syrefri naftalinolie (En sammensat blanding af carbonhydrider tilbageblevet efter fjernelsen af naphthalen fra alkalivasket naphthalenolie ved en krystalliseringsproces. Den er sammensat primært af naphthalen og alkylnaphthalen)	648-089-00-0	310-167-4	121620-48-2	J, M
Destillater (stenkulstjære), naphthalenolier, naphthalenfrie, alkaliske ekstrakter; syrefri naftalinolie (Den tilbageblevne olie efter fjernelse af phenolforbindelser (tjæresyrer) fra drænet naphthalenolie ved en alkalisk vask. Sammensat primært af naphthalen og alkylnaphthalener)	648-090-00-6	292-612-1	90640-90-7	J, M
Ekstrationsrester (kul), naphthalenolie alkaliske, destillationstopfraktioner; syrefri naftalinolie (Destillatet fra alkalivasket naphthalenolie, med destillationsinterval omtrent fra 180 °C til 220 °C. Sammensat primært af naphthalen, alkylbenzener, inden og indan)	648-091-00-1	292-627-3	90641-04-6	J, M

Destillater (stenkulstjære), naphthalenolier, methylnaphthalenfraktion; methylnaftalin (Et destillat fra den fraktionerede destillation af højtemperaturs-stenkulstjære. Sammensat primært af substituerede, bicycliske, aromatiske carbonhydrider og aromatiske nitrogenbaser, med kogeinterval omtrent fra 225 °C til 255 °C)	648-092-00-7	309-985-4	101896-27-9	J, M
Destillater (stenkulstjære), naphthalenolier, indol-methylnaphthalenfraktion; methylnaftalin (Et destillat fra den fraktionerede destillation af højtemperaturs-stenkulstjære. Sammensat primært af indol og methylnaphthalen, med kogeinterval omtrent fra 235 °C til 255 °C)	648-093-00-2	309-972-3	101794-91-6	J, M
Destillater (stenkulstjære), naphthalenolier, syreekstrakter; methylnaftalinolie (En sammensat blanding af carbonhydrider, opnået ved at fjerne baser fra methylnaphthalenfraktionen opnået ved destillation af stenkulstjære, med kogeinterval omtrent fra 230 °C til 255 °C. Indeholder hovedsageligt 1(2)-methylnaphthalen, naphthalen, dimethylnaphthalen og biphenyl)	648-094-00-8	295-309-2	91995-48-1	J, M
Ekstraktionsrester (kul), naphthalenolie alkaliske, destillationsrester; methylnaftalinolie (Resten fra destillationen af alkalivasket naphthalenolie, med destillationsinterval omtrent fra 220 °C til 300 °C. Sammensat primært af naphthalen, alkylbenzener og aromatiske nitrogenbaser)	648-095-00-3	292-628-9	90641-05-7	J, M
Ekstraktionsolier (kul), sure, tjærebase-frie; methylnaftalinolie	648-096-00-9	284-901-6	84989-12-8	J, M

(Ekstraktionsolien, med kogeinterval omtrent fra 220 °C til 265 °C, fra alkaliske stenkulstjære-ekstraktionsrester fremstillet ved en sur vask, såsom vandig svovlsyre, efter destillation for at fjerne tjærebaser. Sammensat primært af alkylnaphthalener)				
Destillater (stenkulstjære), benzolfraktion, destillationsrester; vaskeolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af rå benzol (højtemperaturstenkulstjære). Den kan være en væske med et destillationsinterval omtrent fra 150 °C til 300 °C, eller et halvfast eller fast stof med et smeltepunkt på op til 70 °C. Den er sammensat primært af naphthalen og alkylnaphthalener)	648-097-00-4	310-165-3	121620-46-0	J, M
Kresotolie, højtkogende destillat; vaskeolie (Den højtkogende destillationsfraktion opnået fra højtemperatursforkulningen af bituminøst kul, som yderligere raffineres for at fjerne overskud af krystallinske salte. Den består primært af kresotolie samt nogle af de normale polycykliske aromatiske salte, som er komponenter af stenkulstjæredestillater, fjernede. Den er krystalfri ved omtrent 5 °C)	648-100-00-9	274-565-9	70321-79-8	J, M
Ekstraktionsrester (stenkul), creosotolie sure; syrefri vaskeolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra den basebefriede fraktion fra destillationen af stenkulstjære, med kogeinterval omtrent fra 250 °C til 280 °C. Den består overvejende af biphenyl og isomere diphenylnaphthener)	648-102-00-X	310-189-4	122384-77-4	J, M
Anthracenolie, anthracenpasta; antracenoliefraktion	648-103-00-5	292-603-2	90640-81-6	J, M

(Det anthracenrige faste stof, opnået ved krystallisation og centrifugering af anthracenolie. Det er sammensat primært af anthracen, carbazol og phenanthren)				
Anthracenolie, med lavt indhold af anthracen; antracenoliefraktion (Den tiloversblevne olie efter fjernelse, ved en krystallisationsproces, af et anthracenrigt fast stof (anthracenpasta) fra anthracenolie. Den er sammensat primært af to-, tre- og firleddede aromatiske forbindelser)	648-104-00-0	292-604-8	90640-82-7	J, M
Rester (stenkulstjære), anthracenoliedestillations-; antracenoliefraktion (Resten, fra fraktioneret destillation af rå anthracen, med kogeinterval omtrent fra 340 °C til 400 °C. Den består overvejende af tri- og polycycliske, aromatiske og heterocycliske carbonhydrider)	648-105-00-6	295-505-8	92061-92-2	J, M
Anthracenolie, anthracenpasta, anthracenfraktion; antracenoliefraktion (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af anthracen, opnået ved krystallisation af anthracenolie fra bituminøs højtemperaturstjære, med kogeinterval omtrent fra 330 °C til 350 °C. Den indeholder hovedsageligt anthracen, carbazol og phenenthren)	648-106-00-1	295-275-9	91995-15-2	J, M
Anthracenolie, anthracenpasta, carbazolfraktion; antracenoliefraktion (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af anthracen, opnået ved krystallisation af anthracenolie fra højtemperaturstjære fra bituminøse kul, med kogeinterval omtrent fra 350 °C til 360 °C. Den indeholder hovedsagelig anthracen, carbazol og phenanthren)	648-107-00-7	295-276-4	91995-16-3	J, M

Anthracenolie, anthracenpasta, lette destillationsfraktioner, antracenoliefraktion (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af anthracen, opnået ved krystallisation af anthracenolie fra bituminøs lavtemperaturstjære, med kogeinterval omtrent fra 290 °C til 340 °C. Den indeholder hovedsageligt tricycliske aromater og deres dihydroderivater)	648-108-00-2	295-278-5	91995-17-4	J, M
Tjæreolier, stenkuls-, lavtemperaturs; kultjæreolie, højtkogende (Et destillat fra lavtemperatursstenkulstjære. Sammensat primært af carbonhydrider, phenolforbindelser og aromatiske nitrogenbaser, med kogeinterval omtrent fra 160 °C til 340 °C)	648-109-00-8	309-889-2	101316-87-4	J, M
Phenoler, ammoniakludsekstrakt; alkaliske ekstrakter (Blandingen af phenoler ekstraheret, ved brug af isobutylacetater, fra ammoniakludden, kondenseret fra gassen udviklet ved lavtemperaturdestillation (mindre end 700 °C) af kul. Den består overvejende af en blanding af monohydrerede og dihydrerede phenoler)	648-111-00-9	284-881-9	84988-93-2	J, M
Destillater (stenkulstjære), letolier, alkaliske ekstrakter; alkaliske ekstrakter (Det vandige ekstrakt fra carbololie fremstillet ved en alkalisk vask med f.eks. vandig natriumhydroxid. Sammensat primært af de alkaliske salte af forskellige phenolforbindelser)	648-112-00-4	292-610-0	90640-88-3	J, M
Ekstrakter, stenkulstjæreolie alkaliske; alkaliske ekstrakter (Ekstrakt for stenkulstjæreolie fremstillet ved en alkalisk vask, såsom vandig natriumhydroxid. Sammensat primært af alkalisalte af forskellige	648-113-00-X	266-017-2	65996-83-0	J, M

phenolforbindelser)				
Destillater (stenkulstjære), naphthalenolie, alkaliske ekstrakter; alkaliske ekstrakter (Det vandige ekstrakt fra naphthalenolie fremstillet ved en alkalisk vask med f.eks. vandig natriumhydroxid. Sammensat primært af alkaliske salte af forskellige phenolforbindelser)	648-114-00-5	292-611-6	90640-89-4	J, M
Ekstraktionsrester (kul), tjæreolie alkaliske, carbonaterede, kalkede; råfenol (Produktet opnået ved behandling af et alkalisk stenkulstjæreolieekstrakt med CO_2 og CaO. Sammensat primært af $CaCO_3$, $Ca(OH)_2$, Na_2CO_3 og andre organiske og uorganiske urenheder)	648-115-00-0	292-629-4	90641-06-8	J, M
Tjæresyrer, brunkuls-, rå; råfenol (Et forsuret alkalisk ekstrakt af brunkulstjæredestillat. Sammensat primært af phenol og phenolhomologer)	648-117-00-1	309-888-7	101316-86-3	J, M
Tjæresyrer, brunkulsforgasnings-; råfenol (En sammensat blanding af organiske forbindelser opnået fra brunkulsforgasning. Sammensat primært af C_{6-10}-hydroxyaromatiske phenoler og deres homologer)	648-118-00-7	295-536-7	92062-22-1	J, M
Tjæresyrer, destillationsrester; fenoldestilleret (En rest fra destillationen af råphenol fra kul. Den består overvejende af phenoler, C_8 til og med C_{10}, med blødgøringspunkt fra 60 °C til 80 °C)	648-119-00-2	306-251-5	96690-55-0	J, M
Tjæresyrer, methylphenolfraktion; fenoldestilleret (Fraktionen af tjæresyre, rig på 3- og 4-methylphenol, genvundet ved destillation af råtjæresyre fra	648-120-00-8	284-892-9	84989-04-8	J, M

lavtemperatursstenkulstjære)				
Tjæresyrer, polyalkylphenolfraktion; fenoldestilleret (Fraktionen af tjæresyrer, genvundet ved destillation af rå tjæresyrer fra lavtemperatursstenkulstjære, med kogeinterval omtrent fra 225 °C til 320 °C. Sammensat primært af polyalkylphenoler)	648-121-00-3	284-893-4	84989-05-9	J, M
Tjæresyrer, xylenolfraktion; fenoldestilleret (Fraktionen af tjæresyrer, rig på 2,4- og 2,5-dimethylphenol, genvundet ved destillation af rå tjæresyrer fra lavtemperatursstenkulstjære)	648-122-00-9	284-895-5	84989-06-0	J, M
Tjæresyrer, ethylphenolfraktion; fenoldestilleret (Fraktionen af tjæresyrer, rig på 3- og 4-ethylphenol, genvundet ved destillation af råtjæresyrer fra lavtemperatursstenkulstjære)	648-123-00-4	284-891-3	84989-03-7	J, M
Tjæresyrer, 3,5-xylenolfraktion; fenoldestilleret (Fraktionen af tjæresyrer, rig på 3,5-dimethylphenol, genvundet ved destillation af lavtemperatursstenkulstjæresyrer)	648-124-00-X	284-896-0	84989-07-1	J, M
Tjæresyrer, rester, destillater, første fraktion; fenoldestilleret (Resten fra destillationen i området fra 235 °C til 355 °C af let karbololie)	648-125-00-5	270-713-1	68477-23-6	J, M
Tjæresyrer, cresylske, rester; fenoldestilleret (Resten fra rå stenkulstjæresyrer efter fjernelse af phenol, cresoler, xylenoler og alle højerekogende phenoler. Et sort, fast stof med et smeltepunkt på omtrent 80 °C. Sammensat primært af polyalkylphenoler, harpiksgummier og uorganiske salte)	648-126-00-0	271-418-0	68555-24-8	J, M

Phenoler, C_{9-11}-; fenoldestilleret	648-127-00-6	293-435-2	91079-47-9	J, M
Tjæresyrer, cresylske; fenoldestilleret (En sammensat blanding af organiske forbindelser, opnået fra brunkul, med kogeinterval omtrent fra 200 °C til 230 °C. Den består hovedsageligt af phenoler og pyridinbaser)	648-128-00-1	295-540-9	92062-26-5	J, M
Tjæresyrer, brunkuls-, C_2-alkylphenolfraktion; fenoldestilleret (Destillatet fra syrebehandlingen af alkalisk vasket brunkulstjæredestillat, med kogeinterval omtrent fra 200 °C til 230 °C. Sammensat primært af m- og p-ethylphenol såvel som cresoler og xylenoler)	648-129-00-7	302-662-9	94114-29-1	J, M
Ekstraktionsolier (stenkul), naphtalenolier; syreekstrakt (Det vandige ekstrakt fremstillet ved en sur vask af alkalivasket naphthalenolie. Sammensat primært af syresalte af forskellige aromatiske nitrogenbaser, inklusive pyridin, quinolin og deres alkylderivater)	648-130-00-2	292-623-1	90641-00-2	J, M
Tjære, quinolinderivater; basedestillater	648-131-00-8	271-020-7	68513-87-1	J, M
Tjærebaser, stenkul-, quinolinderivatfraktion; basedestillater	648-132-00-3	274-560-1	70321-67-4	J, M
Tjærebaser, stenkuls-, destillationsrester; basedestillater (Den tilbageblevne destillationsrest efter destillationen af den neutraliserede, syreekstraherede, baseholdige tjærefraktion, opnået ved destillationen af stenkulstjærer. Den indeholder hovedsageligt anilin, collidiner, quinolinderivater og toluidiner)	648-133-00-9	295-544-0	92062-29-8	J, M
Carbonhydridolier, aromatiske, blandet med polyethylen og polypropylen, pyrolyserede, let oliefraktion; varmebehandlede produkter	648-134-00-4	309-745-9	100801-63-6	J, M

(Olien opnået ved varmebehandlingen af en polyethylen/polypropylenblanding med kultjærebeg eller aromatiske olier. Den består overvejende af benzen og dens homologer, med kogeinterval omtrent fra 70 °C til 120 °C)				
Carbonhydridolier, aromatiske, blandet med polyethylen, pyrolyserede, let oliefraktion; varmebehandlede produkter (Olien opnået ved varmebehandlingen af polyethylen med kultjærebeg eller aromatiske olier. Den består overvejende af benzen og dens homologer, med kogeinterval omtrent fra 70 °C til 120 °C)	648-135-00-X	309-748-5	100801-65-8	J, M
Carbonhydridolier, aromatiske, blandet med polystyren, pyrolyserede, let oliefraktion; varmebehandlede produkter (Olien opnået ved varmebehandlingen af polystyren med kultjærebeg eller aromatiske olier. Den består overvejende af benzen og dens homologer, med kogeinterval omtrent fra 70 °C til 210 °C)	648-136-00-5	309-749-0	100801-66-9	J, M
Ekstraktionsrester (kul), alkalisk tjæreolie, naphthalendestillationsrester; syrefri naftalinolie (Resten opnået fra kemisk olie ekstraheret efter fjernelsen af naphthalen ved destillation, består primært af aromatiske carbonhydrider med 2- til 4-leddede kondenserede ringe og aromatiske nitrogenbaser)	648-137-00-0	277-567-8	736665-18-6	J, M
Kresotolie, lavtkogende destillat; vaskeolie (Den lavtkogende destillationsfraktion opnået fra højtemperatursforkulningen af bituminøse kul, som yderligere raffineres for at fjerne overskud af krystallinske salte. Den består overvejende af kresotolie samt nogle af de normale polycykliske aromatiske	648-138-00-6	274-566-4	70321-80-1	J, M

salte, som er komponenter af stenkulstjæredestillat, fjernede. Den er krystalfri ved omtrent 38 °C)				
Tjæresyrer, cresyliske, natriumsalte, kaustiske opløsninger; alkaliske ekstrakter	648-139-00-1	272-361-4	68815-21-4	J, M
Ekstraktionsolier (kul), tjærebase-; syreekstrakt (Ekstrakt fra alkalisk ekstraktionrest af stenkulstjæreolie fremstillet ved en sur vask, såsom vandig svovlsyre, efter destillation for at fjerne naphthalen. Sammensat primært af syresaltene af forskellige aromatiske nitrogenbaser, herunder pyridin, quinolin og deres alkylderivater)	648-140-00-7	266-020-9	65996-86-3	J, M
Tjærebaser, stenkuls-, rå; råtjærebaser (Reaktionsprodukt opnået ved at neutralisere ekstraktionsolie fra stenkulstjærebase med en alkalisk opløsning, såsom vandig natriumhydroxid, for at udvinde de fire baser. Sammensat primært af organiske baser, såsom acridin, phenanthridin, pyridin, quinolin og deres alkylderivater)	648-141-00-2	266-018-8	65996-84-1	J, M
Rester (kul), flydende solventekstraktions-; (Et kohæsivt pulver sammensat af kulmineralsk stof og uopløst kul tilbageblevet efter ekstraktion af kul med et flydende solvent)	648-142-00-8	302-681-2	94114-46-2	M
Kulvæsker, flydende solventekstraktionsopløsning (Produkt opnået ved filtrering af kulmineralsk stof og uopløst kul fra kulekstraktionsopløsning fremstillet ved at omsætte kul i et flydende solvent. En sort, viskøs og højkompleks væskeblanding sammensat primært af aromatiske og delvist hydrogenerede, aromatiske carbonhydrider, aromatiske nitrogenforbindelser, aromatiske	648-143-00-3	302-682-8	94114-47-3	M

svovlforbindelser, phenolske og andre aromatiske oxygenforbindelser og deres alkylderivater)				
Kulvæsker, flydende solventekstraktion (Det substantielle solventfrie produkt opnået ved destillation af solventet fra filtreret kulekstraktionsopløsning fremstillet ved at omsætte kul i et flydende solvent. Et sort, halvfast stof, bestående primært af en sammensat blanding af ringkondenserede, aromatiske carbonhydrider, aromatiske nitrogenforbindelser, aromatiske svovlforbindelser, phenolforbindelser og andre aromatiske oxygenforbindelser og deres alkylderivater)	648-144-00-9	302-683-3	94114-48-4	M
Letolie (kul), koksovns-; rå benzol (Den flygtige, organiske væske ekstraheret fra gassen udviklet ved tørdestillation af kul ved høj temperatur (højere end 700 °C). Sammensat primært af benzen, toluen og xylener. Kan indeholde andre mindre carbonhydridkomponenter)	648-147-00-5	266-012-5	65996-78-3	J
Destillater (kul), flydende solventekstraktion primære (Det flydende produkt fra kondensation af dampe afgivet under omsætningen af kul i et flydende solvent, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 300 °C. Sammensat primært af delvist hydrogenerede, ringkondenserede, aromatiske carbonhydrider, aromatiske forbindelser indeholdende nitrogen, oxygen og svovl og deres alkylderivater, med carbonantal overvejende i området fra C_4 til og med C_{14})	648-148-00-0	302-688-0	94114-52-0	J
Destillater (kul), solventekstraktion hydrokrakket (Destillat opnået ved hydrokrakning af kulekstrakt eller opløsning fremstillet ved flydende solventekstraktions- eller	648-149-00-6	302-689-6	94114-53-1	J

superkritiske gasekstraktionsprocesser, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 300 °C. Sammensat primært af aromatiske, hydrogenerede aromatiske og naphthenske forbindelser, deres alkylderivater og alkaner, overvejende C_4 til og med C_{14}. Nitrogen-, svovl- og oxygenholdige aromatiske og hydrogenerede aromatiske forbindelser er også til stede)				
Naphta (kul), solventekstraktion hydrokrakket (Fraktion af destillatet opnået ved hydrokrakning af kulekstrakt eller opløsning fremstillet ved flydende solventekstraktions- eller superkritiske gasekstraktionsprocesser, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 180 °C. Sammensat primært af aromatiske, hydrogenerede aromatiske og naphthenske forbindelser, deres alkylderivater og alkaner, overvejende C_4 til C_9. Nitrogen-, svovl- og oxygenholdige aromatiske og hydrogenerede aromatiske forbindelser er også til stede)	648-150-00-1	302-690-1	94114-54-2	J
Benzin, kul solventekstraktion, hydrokrakket naphtha (Motorbrændstof fremstillet ved reformering af den raffinerede naphthafraktion fra produkterne fra hydrokrakning af kulekstrakt eller opløsning, fremstillet ved flydende solventekstraktions- eller superkritiske gasekstraktionsprocesser, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 180 °C. Sammensat primært af aromatiske og naphthenske carbonhydrider, deres alkylderivater og alkylcarbonhydrider, C_4 til og med C_9)	648-151-00-7	302-691-7	94114-55-3	J
Destillater (kul), solventekstraktion hydrokrakkede middeltunge (Destillat opnået ved hydrokrakning af kulekstrakt eller opløsning, fremstillet ved flydende solventekstraktions- eller superkritiske gasekstraktionsprocesser,	648-152-00-2	302-692-2	94114-56-4	J

med kogeinterval omtrent fra 180 °C til 300 °C. Sammensat primært af bicycliske aromatiske, hydrogenerede aromatiske og naphthenske forbindelser, deres alkylderivater og alkaner, overvejende C_9 til og med C_{14}. Nitrogen-, svovl- og oxygenholdige forbindelser er også til stede)				
Destillater (kul), solventekstraktion hydrokrakkede hydrogenerede middeltunge (Destillat fra hydrogeneringen af et hydrokrakket middeltungt destillat fra kulekstrakt eller opløsning, fremstillet ved flydende solventekstraktions- eller superkritiske gasekstraktionsprocesser, med kogeinterval omtrent fra 180 °C til 280 °C. Sammensat primært af hydrogenerede, bicycliske carbonforbindelser og deres alkylderivater, overvejende C_9 til og med C_{14})	648-153-00-8	302-693-8	94114-57-5	J
Letolie (kul), halvforkoksningsproces-; frisk olie (Den flygtige organiske væske kondenseret fra gassen udviklet ved lavtemperaturs (lavere end 700 °C) destruktiv destillation af kul. Sammensat primært af C_{6-10}-carbonhydrider)	648-156-00-4	292-635-7	90641-11-5	J
Ekstrakter (råolie), let naphthendestillat solvent	649-001-00-3	265-102-1	64742-03-6	
Ekstrakter (råolie), tungt paraffindestillat solvent	649-002-00-9	265-103-7	64742-04-7	
Ekstrakter (råolie), let paraffindestillat solvent	649-003-00-4	265-104-2	64742-05-8	
Ekstrakter (råolie), tungt naphthendestillat solvent	649-004-00-X	265-111-0	64742-11-6	
Ekstrakter (råolie), let vakuumgasolie solvent	649-005-00-5	295-341-7	91995-78-7	
Carbonhydrider, C_{26-55}, aromatrige	649-006-00-0	307-753-7	97722-04-8	

Rester (råolie), atmosfærisk tårn; fuelolie (En sammensat remanens fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{20}, og koger omtrent over 350 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-008-00-1	265-045-2	64741-45-3	
Gasolier (råolie), tunge vakuum; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved vakuumdestillation af remanensen fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, med kogeinterval omtrent fra 350 °C til 600 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-009-00-7	265-058-3	64741-57-7	
Destillater (råolie), tunge katalytisk krakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{35}, med kogeinterval omtrent fra 260 °C til 500 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-010-00-2	265-063-0	64741-61-3	
Klarede olier (råolie), katalytisk krakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillation af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af	649-011-00-8	265-064-6	64741-62-4	

carbonhydrider, overvejende større end C_{20}, og koger omtrent over 350 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)				
Rester (råolie), hydrokrakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillation af produkterne fra en hydrokrakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{20}, og koger omtrent over 350 °C)	649-012-00-3	265-076-1	64741-75-9	
Rester (råolie), termisk krakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillation af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende større end C_{20}, og koger omtrent over 350 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-013-00-9	265-081-9	64741-80-6	
Destillater (råolie), tunge termisk krakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{36}, med kogeinterval omtrent fra 260 °C til 480 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående, af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-014-00-4	265-082-4	64741-81-7	
Gasolier (råolie), hydrogenbehandlede vakuum-; fuelolie	649-015-00-X	265-162-9	64742-59-2	

(En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{50}, med kogeinterval omtrent fra 230 °C til 600 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)				
Rester (råolie), hydroafsvovlede atmosfærisk tårn; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en remanens fra et atmosfærisk tårn med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator, under betingelser primært for at fjerne organiske svovlforbindelser. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{20}, og koger omtrent over 350 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-016-00-5	265-181-2	64742-78-5	
Gasolier (råolie), hydroafsvovlede tunge vakuum-; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk hydroafsvovlningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, med kogeinterval omtrent fra 350 °C til 600 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-017-00-0	265-189-6	64742-86-5	
Rester (råolie), dampkrakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som restfraktionen fra destillation af produkterne fra en dampkrakningsproces (herunder dampkrakning for at fremstille ethylen).	649-018-00-6	265-193-8	64742-90-1	

Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende større end C_{14}, og koger omtrent over 260 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)				
Rester (råolie), atmosfæriske; fuelolie (En sammensat remanens fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{11}, og koger omtrent over 200 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-019-00-1	269-777-3	68333-22-2	
Klarede olier (råolie), hydroafsvovlede katalytisk krakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle katalytisk krakkede, klarede olier med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, som fjernes. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{20}, og koger omtrent over 350 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4-; til 6-leddede kondenserede ringe)	649-020-00-7	269-782-0	68333-26-6	
Destillater (råolie), hydroafsvovlede intermediære katalytisk krakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle intermediære katalytisk krakkede destillater med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, som fjernes. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{30}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 450 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del tricycliske, aromatiske carbonhydrider)	649-021-00-2	269-783-6	68333-27-7	

Destillater (råolie), hydroafsvovlede, tunge, katalytisk krakkede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af tunge katalytisk krakkede destillater med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, som fjernes. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{35}, med kogeinterval omtrent fra 260 °C til 500 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-022-00-8	269-784-1	68333-28-8	
Brændselsolie, rester af straight-run gasolier, med højt indhold af svovl; fuelolie	649-023-00-3	270-674-0	68476-32-4	
Brændselsolie, rest; fuelolie (Væskeproduktet fra forskellige raffinaderistrømme, sædvanligvis rester. Sammensætningen er kompleks og varierer med råoliekilden)	649-024-00-9	270-675-6	68476-33-5	
Rester (råolie), katalytisk reformerfraktioneringskolonnerest, destillations-; fuelolie (En sammensat remanens fra destillationen af katalytisk reformer-fraktioneringskolonnerest. Den koger omtrent over 399 °C)	649-025-00-4	270-792-2	68478-13-7	
Rester (råolie), tung cokergasolie og vakuumgasolie; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillationen af tung cokergasolie og vakuumgasolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende større end C_{13}, og koger omtrent over 230 °C)	649-026-00-X	270-796-4	68478-17-1	
Rester (råolie), tunge coker- og lette vakuum-; fuelolie (En sammensat blanding af	649-027-00-5	270-983-0	68512-61-8	

carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillation af tung cokergasolie og let vakuumgasolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende større end C_{13}, og koger omtrent over 230 °C)				
Rester (råolie), lette vakuum-; fuelolie (En sammensat remanens fra vakuumdestillationen af remanensen fra den atmosfæriske destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{13}, og koger omtrent over 230 °C)	649-028-00-0	270-984-6	68512-62-9	
Rester (råolie), dampkrakkede, lette; fuelolie (En sammensat remanens fra destillationen af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af aromatiske og umættede carbonhydrider, større end C_7, med kogeinterval omtrent fra 101 °C til 555 °C)	649-029-00-6	271-013-9	68513-69-9	
Brændselsolie, nr. 6; fuelolie (En brændselsolie med en minimumsviskositet på ~~900 cSt~~ ⌦ 197 10^{-6} m².s^{-1} ved 37,7 °C ⌫ og en maksimumsviskositet på ~~9 000 cSt~~ ⌦ 197 10^{-5} m².s^{-1} ⌫ ved 37,7 °C)	649-030-00-1	271-384-7	68553-00-4	
Rester (råolie, topanlægs-, svovlfattige; fuelolie (En sammensat, svovlfattig blanding af carbonhybrider fremstillet som restfraktionen fra topanlægsdestillation af råolie. Den udgør resten, efter at straight-run benzinfraktionen, petroleumfraktionen og gasoliefraktionen er blevet fjernet)	649-031-00-7	271-763-7	68607-30-7	
Gasolier (råolie), tunge, atmosfæriske; fuelolie (En sammensat, blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af råolie. Den består af	649-032-00-2	272-184-2	68783-08-4	

carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{35}, med kogeinterval omtrent fra 121 °C til 510 °C)				
Rester (råolie), coker-skrubber-, indeholder kondenserede aromater; fuelolie (En meget sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillationen af vakuumremanensen og produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende større end C_{20} og koger omtrent over 350 °C. Denne strøm indeholder sandynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-033-00-8	272-187-9	68783-13-1	
Destillater (råolie), råolierester, vakuum-; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider ved vakuumdestillationen af remanensen fra den atmosfæriske destillation af råolie)	649-034-00-3	273-263-4	68955-27-1	
Rester (råolie), dampkrakkede, harpiksholdige; fuelolie (En sammensat remanens fra destillationen af dampkrakkede råolierester)	649-035-00-9	273-272-3	68955-36-2	
Destillater (råolie), intermediære vakuum-; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhybrider fremstillet ved destillationen af remanensen af den atmosfæriske destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{14} til og med C_{42} og koger omtrent i intervallet fra 250 °C til 545 °C. Denne strøm indeholder sandynligvis 5 vægtprocent, eller mere af 4- til 6-leddede kondenserede aromatiske carbonhydrider)	649-036-00-4	274-683-0	70592-76-6	
Destillater (råolie), lette vakuum-;	649-037-00-	247-684-6	70592-77-7	

fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved vakuumdestillationen af remanensen fra den atmosfæriske destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{35}, med kogeinterval omtrent fra 250 °C til 545 °C)	X			
Destillater (råolie), vakuum-; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved vakuumdestillationen af remanensen fra den atmosfæriske destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{50}, med kogeinterval omtrent fra 270 °C til 600 °C. Denne strøm kan indeholde 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-038-00-5	274-685-1	70592-78-8	
Gasolier (råolie), hydroafsvovlede, tunge coker-vakuum-; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved hydroafsvovling af tunge coker-destillatråstoffer. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{18} til C_{44}, med kogeinterval omtrent fra 304 °C til 548 °C. Indeholder sandsynligvis 5 ⌦ vægtprocent ⌫ ~~%~~, eller mere, aromatiske carbonhydrider bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-039-00-0	285-555-9	85117-03-9	
Rester (råolie), dampkrakkede, destillater; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået under fremstillingen af raffineret råolietjære ved destillation af dampkrakket tjære. Den består overvejende af aromatiske og andre carbonhydrider organiske svovlforbindelser)	649-040-00-6	292-657-7	90669-75-3	
Rester (råolie), vakuum-, lette; fuelolie	649-041-00-1	292-658-2	90669-76-4	

(En sammensat remanens fra vakuumdestillation af remanensen fra atmosfærisk destillation af råolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende større end C_{24}, og koger omtrent over 390 °C)				
Brændselsolie, tung, højt svovlindhold; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af rå råolie. Den består overvejende af aliphatiske, aromatiske og cycloaliphatiske carbonhydrider, overvejende større end C_{25}, der koger højere end omtrent over 400 °C)	649-042-00-7	295-396-7	92045-14-2	
Rester (råolie), katalytiske kraknings-; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillationen af produkterne fra en katalytisk krakningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende større end C_{11}, der koger omtrent over 200 °C)	649-043-00-2	295-511-0	92061-97-7	
Destillater (råolie), intermediære, katalytisk krakkede, termisk nedbrudte; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider, fremstillet ved destillationen af produkter fra en katalytisk krakningsproces, som har været brugt som en varmeoverførselsvæske. Den består overvejende af carbonhydrider med kogeinterval omtrent fra 220 °C til 450 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis organiske svovlforbindelser)	649-044-00-8	295-990-6	92201-59-7	
Restolier (råolie); fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider, svovlforbindelser og metalholdige organiske forbindelser opnået som resten fra	649-045-00-3	298-754-0	93821-66-0	

raffinaderifraktionerings-krakningsprocesser. Den danner en færdig olie med viskositet over ~~2 cSt ved 100 °C~~ ⌦ 2 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 100 °C ⌫)				
Rester, dampkrakkede, termisk behandlede; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling og destillation af rå, dampkrakket naphtha. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, der koger omtrent over 180 °C)	649-046-00-9	308-733-0	98219-64-8	
Destillater (råolie), hydroafsvovlede, full-range, middeltunge; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en rå råolie med hydrogen. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 400 °C)	649-047-00-4	309-863-0	101316-57-8	
Rester (råolie), katalytiske reformer-fraktionator-; fuelolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet som restfraktionen fra destillation af produkterne fra en katalytisk reformeringsproces. Den består af overvejende aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{10} til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 160 °C til 400 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-048-00-X	265-069-3	64741-67-9	
Råolie; råolie (En sammensat blanding af carbonhydrider. Den består overvejende af aliphatiske, alicycliske og aromatiske carbonhydrider. Den kan også indeholde små mængder af nitrogen-, oxygen- og svovlforbindelser. Denne	649-049-00-5	232-298-5	8002-05-9	

kategori omfatter lette, middeltunge og tunge råolier, såvel som olier ekstraherede fra tjæresand. Carbonhydridholdige materialer, der kræver større kemiske forandringer for deres udvinding eller omdannelse til råolieraffinaderiføde såsom rå skiferolier, oprensede skiferolier og flydende kulbrændsel er ikke medtaget i denne beskrivelse)				
Gasser (råolie), katalytisk krakkede, naphtha-depropanizer-topfraktion, C_3-rige syrefrie; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering af katalytisk krakkede carbonhydrider og behandlet for at fjerne sure urenheder. Den består af carbonhydrider, C_2 til og med C_4, overvejende C_3)	649-062-00-6	270-755-0	68477-73-6	K
Gasser (råolie), katalytiske krakker-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en katalytisk krakningsproces. Den består overvejende af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)	649-063-00-1	270-756-6	68477-74-7	K
Gasser (råolie), katalytiske krakker-, C_{1-5}-rige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af aliphatiske carbonhydrider, C_1 til og med C_6, overvejende C_1 til og med C_5)	649-064-00-7	270-757-1	68477-75-8	K
Gasser (råolie), katalytisk polymeriseret naphtha-stabilizer-topfraktion, C_{2-4}-rige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringsstabiliseringen af katalytisk polymeriseret nahptha. Den	649-065-00-2	270-758-7	68477-76-9	K

består af aliphatiske carbonhydrider, C_2 til og med C_6, overvejende C_2 til og med C_4)				
Gasser (råolie), katalytiske reformer-, C_{1-4}-rige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra en katalytisk reformeringsproces. Den består af carbonhydrider, C_1 til og med C_6, overvejende C_1 til og med C_4)	649-066-00-8	270-760-8	68477-79-2	K
Gasser (råolie), C_{3-5}-olefin- og paraffin-alkyleringsføde-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af olefin- og paraffin-carbonhydrider, C_3 til og med C_5, der anvendes som alkyleringsføde. De omgivende temperaturer overskrider normalt disse blandingers kritiske temperatur)	649-067-00-3	270-765-5	68477-83-8	K
Gasser (råolie), C_4-rige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra en katalytisk fraktioneringsproces. Den består af aliphatiske carbonhydrider, C_3 til og med C_5, overvejende C_4)	649-068-00-9	270-767-6	68477-85-0	K
Gasser (råolie), deethanizer-topfraktioner; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af gas- og benzinfraktionerne fra den katalytiske krakningsproces. Den indeholder overvejende ethan og ethylen)	649-069-00-4	270-768-1	68477-86-1	K
Gasser (råolie), deisobutanizertårn-topfraktioner; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved den atmosfæriske destillation af en butan-butylenstrøm. Den består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_4)	649-070-00-X	270-769-7	68477-87-2	K

Gasser (råolie), tørre depropanizer-, propenrige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkter fra gas- og benzinfraktionerne fra en katalytisk krakningsproces. Den består overvejende af propylen med noget ethan og propan)	649-071-00-5	270-772-3	68477-90-7	K
Gasser (råolie), depropanizer-topfraktioner; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra gas- og benzinfraktionerne fra en katalytisk krakningsproces. Den består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_4)	649-072-00-0	270-773-9	68477-91-8	K
Gasser (råolie), gasgenudvindingsanlæg-depropanizer-topfraktioner; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering af diverse carbonhydridstømme. Den består overvejende af carbonhydrider, C_1 til og med C_4, overvejende propan)	649-073-00-6	270-777-0	68477-94-1	K
Gasser (råolie), Girbatol-enhed, føde-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider, der anvendes som føde i Girbatol-enheden for at fjerne hydrogensulfid. Den består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_4)	649-074-00-1	270-778-6	68477-95-2	K
Gasser (råolie), isomeriseret naphtha-fraktioneringskolonne-, C_4-rige, hydrogensulfidfri; kulbrintegasser	649-075-00-7	270-782-8	68477-99-6	K
Slutgas (råolie), katalytisk krakket, klaret olie og termisk krakket vakuumrest-fraktioneringsrefluxkammer;	649-076-00-2	270-802-5	68478-21-7	K

kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering af katalytisk krakket, klaret olie og termisk krakket vakuumrest. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)				
Slutgas (råolie), katalytisk krakket naphtha-stabiliseringsabsorber-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved stabiliseringen af katalytisk krakket naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)	649-077-00-8	270-803-0	68478-22-8	K
Slutgas (råolie), katalytisk krakker-, katalytisk reformer- og hydroafsvovler-, kombineret fraktioneringskolonne-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider, opnået ved fraktioneringen af produkterne fra katalytiske kraknings-, katalytiske reformerings- og hydroafsvovlingsprocesser, behandlet for at fjerne sure urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-078-00-3	270-804-6	68478-24-0	K
Slutgas (råolie), katalytisk reformeret naphtha-fraktioneringsstabilizer-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringsstabiliseringen af katalytisk reformeret naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-079-00-9	270-806-7	68478-26-2	K
Slutgas (råolie), saturatgas, blandet anlægsstrøm, C_4-rig, kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra	649-080-00-4	270-813-5	68478-32-0	K

fraktioneringsstabilisationen af straight-run naphtha, destillationsslutgas og katalytisk reformeret naphthastabilizerslutgas. Den består af carbonhydrider, C_3 til og med C_6, overvejende butan og isobutan)				
Slutgas (råolie), saturatgas, anlægsgenindvindings-, C_{1-2}-rig; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra fraktionering af destillatslutgas, straight-run-naphtha, katalytisk reformeret naphthastabilizerslutgas. Den består overvejende af carbonhydrider, C_1 til og med C_5, overvejende methan og ethan)	649-081-00-X	270-814-0	68478-33-1	K
Slutgas (råolie), vakuumrester, termisk krakker-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved den termiske krakning af vakuumrester. Den består af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-082-00-5	270-815-6	68478-34-2	K
Carbonhydrider, C_{3-4}-rige, råoliedestillat; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation og kondensation af råolie. Den består af carbonhydrider, C_3 til og med C_5, overvejende C_3 til og med C_4)	649-083-00-0	270-990-9	68512-91-4	K
Gasser (råolie), full-range-, straight-run-naphtha-dehexanizer-aftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af full-range-, straight-run-naphtha. Den består af carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_6)	649-084-00-6	271-000-8	68513-15-5	K
Gasser (råolie), hydrokrakningsdepropanizer-aftræks-, carbonhydridrige; kulbrintegasser	649-085-00-1	271-001-3	68513-16-6	K

(En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en hydrokrakningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4. Den kan også indeholde små mængder hydrogen og hydrogensulfid)				
Gasser (råolie), let straight-run-naphtha-stabilizer-aftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved stabiliseringen af let straight-run-naphtha. Den består af mættede, aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_6)	649-086-00-7	271-002-9	68513-17-7	K
Rester (råolie) alkyleringssplitter-, C_4-rige; kulbrintegasser (En sammensat remanens fra destillationen af strømme fra forskellige raffinaderiprocesser. Den består af carbonhydrider, C_4 til og med C_5, overvejende butan, med kogeinterval omtrent fra −11,7 °C til 27,8 °C)	649-087-00-2	271-010-2	68513-66-6	K
Carbonhydrider, C_{1-4}-, sweetenede; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste carbonhydrider en sweetening-proces for at omdanne mercaptaner eller for at fjerne sure urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4, med kogeinterval omtrent fra −164 °C til −0,5 °C)	649-089-00-3	271-038-5	68514-36-3	K
Carbonhydrider, C_{1-3}-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_3, med kogeinterval omtrent fra −164 °C til −42 °C)	649-090-00-9	271-259-7	68527-16-2	K
Carbonhydrider, C_{1-4}-, debutanizer-	649-091-00-4	271-261-8	68527-19-5	K

fraktion; kulbrintegasser				
Gasser (råolie), C_{1-5-}, våde; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af råolie og/eller krakningen af tårn-gasolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-092-00-X	271-624-0	68602-83-5	K
Carbonhydrider, C_{2-4-}; kulbrintegasser	649-093-00-5	271-734-9	68606-25-7	K
Carbonhydrider, C_{3-}; kulbrintegasser	649-094-00-0	271-735-4	68606-26-8	K
Gasser (råolie), alkyleringsføde; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved den katalytiske krakning af gasolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_4)	649-095-00-6	271-737-5	68606-27-9	K
Gasser (råolie), depropanizer-bundfraktioner, fraktioneringsaftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af depropanizer-bundfraktioner. Den består overvejende af butan, isobutan og butadien)	649-096-00-1	271-742-2	68606-34-8	K
Gasser (råolie), raffinaderiblandings-; kulbrintegasser (En sammensat blanding, opnået fra varierende raffinaderiprocesser. Den består af hydrogen, hydrogensulfid og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-097-00-7	272-183-7	68783-07-3	K
Gasser (råolie), katalytisk krakkede; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra en katalytisk krakningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider,	649-098-00-2	272-203-4	68783-64-2	K

overvejende C_3 til og med C_5)				
Gasser (råolie), C_{2-4-}, sweetenede; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste et råoliedestillat en sweeteningsproces for at omdanne mercaptaner eller fjerne sure urenheder. Den består overvejende af mættede og umættede carbonhydrider, overvejende fra C_2 til og med C_4, med kogeinterval omtrent fra −51 °C til −34 °C)	649-099-00-8	272-205-5	68783-65-3	K
Gasser(råolie), råoliefraktioneringsaftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved fraktioneringen af råolie. Den består af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_5)	649-100-00-1	272-871-7	68918-99-0	K
Gasser (råolie), dehexanizer-aftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af kombinerede naphthastrømme. Den består af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_5)	649-101-00-7	272-872-2	68919-00-6	K
Gasser (råolie), let straight-run-benzin-fraktioneringsstabilizeraftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af let straight-run-benzin. Den består af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_5)	649-102-00-2	272-878-5	68919-05-1	K
Gasser (råolie), naphthaunifiner-afsvovling-stripperaftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en	649-103-00-8	272-879-0	68919-06-2	K

naphtha-unifiner-afsvovlingsproces og strippet fra naphthaproduktet. Den består af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_4)				
Gasser (råolie), straight-run-naphtha-katalytisk reformeringsaftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved den katalytiske reformering af straight-run-naphtha og fraktionering af det totale udløb. Den består af methan, ehtan og propan)	649-104-00-3	272-882-7	68919-09-5	K
Gasser(råolie), fluidiseret katalytisk krakker-splitter-topfraktioner; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved fraktioneringen af chargen til C_3-C_4-splitteren. Den består overvejende af C_3-carbonhydrider)	649-105-00-9	272-893-7	68919-20-0	K
Gasser (råolie), straight-run-stabilizeraftræks-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra fraktioneringen af væsken fra det første tårn brugt ved destillationen af råolie. Den består af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_4)	649-106-00-4	272-883-2	68919-10-8	K
Gasser (råolie), katalytisk krakker-naphtha-debutanizer-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af katalytisk krakket naphtha. Den består af carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_4)	649-107-00-X	273-169-3	68952-76-1	K
Slutgas (råolie), katalytisk krakkerdestillat og naphthastabilizer-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af	649-108-00-5	273-170-9	68952-77-2	K

carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af katalytisk krakket naphtha og destillat. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_4)				
Slutgas (råolie), termisk krakket destillat, gasolie og naphtha-absorber-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved separationen af termisk krakkede destillater, naphtha og gasolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_6)	649-109-00-0	273-175-6	68952-81-8	K
Slutgas (råolie), termisk krakket carbonhydrid-fraktioneringsstabilizer, råolieforkoksning-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringsstabilisationen af termisk krakkede carbonhydrider fra en råolieforkoksningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_6)	649-110-00-6	273-176-1	68952-82-9	K
Gasser (råolie), lette, dampkrakkede, butadienkoncentrat; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4)	649-111-00-1	273-265-5	68955-28-2	K
Gasser (råolie), straight-run-naphtha, katalytisk reformer-stabilizer-topfraktions-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved den katalytiske reformering af straight-run-naphtha og fraktioneringen af det totale udløb. Den består af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_4)	649-112-00-7	273-270-2	68955-34-0	K
Carbonhydrider, C_4-; kulbrintegasser	649-113-00-2	289-339-5	87741-01-3	K

Alkaner, C_{1-4}-, C_3-rige; kulbrintegasser	649-114-00-8	292-456-4	90622-55-2	K
Gasser (råolie), dampkrakker-, C_3-rige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af propylen, sammen med noget propan, og koger i intervallet omtrent fra −70 °C til 0 °C)	649-115-00-3	295-404-9	92045-22-2	K
Carbonhydrider, C_4-, dampkrakker-destillat; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af C_4-carbonhydrider, overvejende 1-buten og 2-buten, og indeholder også butan og isobuten, med kogeinterval omtrent fra −12 °C til 5 °C)	649-116-00-9	295-405-4	92045-23-3	K
Råoliegasser, fortættede, sweetenede, C_4-fraktion; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste en fortættet råoliegasblanding en sweeteningproces for at omdanne mercaptaner eller fjerne sure urenheder. Den består overvejende af C_4-mættede carbonhydrider)	649-117-00-4	295-463-0	92045-80-2	K
Carbonhydrider, C_4-, 1,3-butadien- og isobutenfri; kulbrintegasser	649-118-00-X	306-004-1	95465-89-7	K
Raffinater (råolie), dampkrakket C_4-fraktion, cupro-, ammonium- og acetatekstraktion, C_{3-5}- og C_{3-5}-umættede, butadienfrie; kulbrintegasser	649-119-00-5	307-769-4	97722-19-5	K
Gasser (råolie), aminsystemføde-; raffinaderigas (Fødegassen til aminsystemet for fjernelse af hydrogensulfid. Den består af hydrogen. Carbonmonoxid, carbondioxid, hydrogensulfid og	649-120-00-0	270-746-1	68477-65-6	K

aliphatiske carbonhydrider, C_1 til og med C_5 kan også være til stede)				
Gasser (råolie), benzenenheds-hydroafsvovleraftræks-; raffinaderigas (Aftræksgasser dannet af benzenenheden. De består primært af hydrogen. Carbonmonoxid og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6, herunder benzen, kan også være til stede)	649-121-00-6	270-747-7	68477-66-7	K
Gasser (råolie), benzenenhed recirkulations- hydrogenrige; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at recirkulere gasserne fra benzenenheden. Den består primært af hydrogen med forskellige små mængder carbonmonoxid og carbonhydrider, C_1 til og med C_6)	649-122-00-1	270-748-2	68477-67-8	K
Gasser (råolie), blandingsolie-, hydrogen- og nitrogenrige; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af en blandingsolie. Den består primært af hydrogen og nitrogen med forskellige små mængder carbonmonoxid, carbondioxid og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-123-00-7	270-749-8	68477-68-9	K
Gasser (råolie), katalytisk reformeret naphtha-stripper-topfraktioner; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved stabiliseringen af katalytisk reformeret naphtha. Den består af hydrogen og mættede, aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-124-00-2	270-759-2	68477-77-0	K
Gasser (råolie), C_{6-8}-katalytisk reformer-recirkulations-, raffinaderigas	649-125-00-8	270-761-3	68477-80-5	K

(En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra katalytisk reformering af C_{6-8}-føde, og recirkuleret for at bevare hydrogen. Den består primært af hydrogen. Den kan også indeholde varierende små mængder carbonmonoxid, carbondioxid, nitrogen og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)				
Gasser (råolie), C_{6-8}-katalytisk reformer-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra katalytisk reformering af C_{6-8}-føde. Den består af carbonhydrider, C_1 til og med C_5, og hydrogen)	649-126-00-3	270-762-9	68477-81-6	K
Gasser (råolie), C_{6-8}-katalytisk reformer-recirkulations-, hydrogenrige; raffinaderigas	649-127-00-9	270-763-4	68477-82-7	K
Gasser (råolie), C_2-returstrøms-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved ekstraktionen af hydrogen fra en gasstrøm, som primært består af hydrogen med små mængder nitrogen, carbonmonoxid, methan, ethan og ethylen. Den består overvejende af carbonhydrider, såsom methan, ethan og ethylen, med små mængder hydrogen, nitrogen og carbonmonoxid)	649-128-00-4	270-766-0	68477-84-9	K
Gasser (råolie), tørre, sure, gaskoncentreringsenhed-aftræks-; raffinaderigas (Den sammensatte blanding af tørre gasser fra en gaskoncentreringsenhed. Den består af hydrogen, hydrogensulfid og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_3)	649-129-00-X	270-774-4	68477-92-9	K
Gasser (råolie), gaskoncentreringsreabsorberdestillation	649-130-00-5	270-776-5	68477-93-0	K

s-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra blandede gasstrømme i en gaskoncentreringsreabsorber. Den består overvejende af hydrogen, carbonmonoxid, carbondioxid, nitrogen, hydrogensulfid og carbonhydrider, C_1 til og med C_3)				
Gasser (råolie), hydrogenabsorber-aftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået ved at absorbere hydrogen fra en hydrogenrig strøm. Den består af hydrogen, carbonmonoxid, nitrogen og methan med små mængder C_2-carbonhydrider)	649-131-00-0	270-779-1	68477-96-3	K
Gasser (råolie), hydrogenrige; raffinaderigas (En sammensat blanding separeret som en gas fra carbonhydridgasser ved afkøling. Den består primært af hydrogen med forskellige små mængder carbonmonoxid, nitrogen, methan og C_2-carbonhydrider)	649-132-00-6	270-780-7	68477-97-4	K
Gasser (råolie), hydrogenbehandler-blandingsolierecirkulations-, hydrogen- og nitrogenrige; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra recirkuleret hydrogenbehandlet blandingsolie. Den består primært af hydrogen og nitrogen med forskellige små mængder carbonmonoxid, carbondioxid og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-133-00-1	270-781-2	68477-98-5	K
Gasser (råolie), recirkulations-, hydrogenrige; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra recirkulerede reaktorgasser. Den består primært af hydrogen med forskellige små mængder carbonmonoxid, carbondioxid, nitrogen, hydorgensulfid og mættede, aliphatiske carbonhydrider,	649-134-00-7	270-783-3	68478-00-2	K

C_1 til og med C_5)				
Gasser (råolie), reformer-make-up, hydrogenrige; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra reformerne. Den består primært af hydrogen med forskellige små mængder carbonmonoxid og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-135-00-2	270-784-9	68478-01-3	K
Gasser (råolie), reformeringshydrogenbehandler-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra reformeringshydrogenbehandlingsprocessen. Den består primært af hydrogen, methan og ethan med forskellige små mængder hydrogensulfid og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_5)	649-136-00-8	270-785-4	68478-02-4	K
Gasser (råolie), reformeringshydrogenbehandler-, hydrogen- og methanrige; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra reformeringshydrogenbehandlingsprocessen. Den består primært af hydrogen og methan med forskellige små mængder carbonmonoxid, carbondioxid, nitrogen og mættede, aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_5)	649-137-00-3	270-787-5	68478-03-5	K
Gasser (råolie), reformeringshydrogenbehandler-make-up-, hydrogenrige; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra reformeringshydrogenbehandlingsprocessen. Den består primært af hydrogen med forskellige små mængder carbonmonoxid og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-138-00-9	270-788-0	68478-04-6	K
Gasser (råolie), termisk krakning, destillations-; raffinaderigas	649-139-00-4	270-789-6	68478-05-7	K

(En sammensat blanding fremstillet ved destillation af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består af hydrogen, hydrogensulfid, carbonmonoxid, carbondioxid og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)				
Slutgas (råolie), katalytisk krakker-refraktioneringsabsorber-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_3)	649-140-00-X	270-805-1	68478-25-1	K
Slutgas (råolie), katalytisk reformeret naphtha-separator-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved den katalytiske reformering af straight-run-naphtha. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)	649-141-00-5	270-807-2	68478-27-3	K
Slutgas (råolie), katalytisk reformeret naphtha-stabilizer-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved stabiliseringen af katalytisk reformeret naphtha. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)	649-142-00-0	270-808-8	68478-28-4	K
Slutgas (råolie), krakket destillat, hydrogenbehandlerseparator-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle krakkede destillater med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af hydrogen og mættede, aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-143-00-6	270-809-3	68478-29-5	K

Slutgas (råolie), hydroafsvovlet straight-run-naphtha-separator-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved hydroafsvovling af straight-run-naphtha. Den består af hydrogen og mættede, aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)	649-144-00-1	270-810-9	68478-30-8	K
Gasser (råolie), katalytisk reformeret straight-run-naphtha-stabilizer-topfraktioner; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved den katalytiske reformering af straight-run-naphtha, efterfulgt af fraktionering af det totale udløb. Den består af hydrogen, methan, ethan og propan)	649-145-00-7	270-999-8	68513-14-4	K
Gasser(råolie), reformerudløbs-højtryksflashkammer-aftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet ved højtryksflashing af udløbet fra reformeringsreaktoren. Den består primært af hydrogen med forskellige små mængder methan, ethan og progan)	649-146-00-2	271-003-4	68513-18-8	K
Gasser (råolie), reformerudløbs-lavtryksflashkammer-aftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet ved lavtryksflashing af udløbet fra reformeringsreaktoren. Den består primært af hydrogen med forskellige små mængder methan, ethan og propan)	649-147-00-8	271-005-5	68513-19-9	K
Gasser (råolie), olieraffinaderigas, destillationsaftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding, separeret ved destillation af en gasstrøm, indeholdende hydrogen, carbonmonoxid, carbondioxid og carbonhydrider, C_1 til og med C_6, eller opnået ved krakning af ethan og propan. Den består af carbonhydrider,	649-148-00-3	271-258-1	68527-15-1	K

overvejende C_1 til og med C_2, hydrogen, nitrogen og carbonmonoxid)				
Gasser (råolie), benzenenhed-hydrogenbehandler-depentanizer-topfraktioner; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet ved at behandle føden fra benzenenheden med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator, efterfulgt af depentanisering. Den består primært af hydrogen, ethan og propan med forskellige små mængder nitrogen, carbonmonoxid, carbondioxid og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6. Den kan indeholde spormængder af benzen)	649-149-00-9	271-623-5	68602-82-4	K
Gasser (råolie), sekundære absorberaftræks-, fluidiserede katalytisk krakker-topfraktioner-fraktionerings-; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet ved fraktioneringen af topfraktionsprodukterne fra den katalytiske krakningsproces i den fluidiserede katalytiske krakker. Den består af hydrogen, nitrogen og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_3)	649-150-00-4	271-625-6	68602-84-6	K
Råolieprodukter, raffinaderigasser; raffinaderigas; (En sammensat blanding, som primært består af hydrogen med forskellige små mængder methan, ethan og propan)	649-151-~~0~~ ⌦ 00 ⌫ -X	271-750-6	68607-11-4	K
Gasser (råolie), hydrokrakning, lavtryksseparator-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået ved væske-dampseparationen af udløbet fra hydrokrakningsprocesreaktoren. Den består overvejende af hydrogen og mættede carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_3)	649-152-00-5	272-182-1	68783-06-2	K
Gasser (råolie), raffinaderi; raffinaderigas	649-153-00-0	272-338-9	68814-67-5	K

(En sammensat blanding opnået fra forskellige råolieraffineringsoperationer. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_3)				
Gasser (råolie), platformerprodukter, separatoraftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra den kemiske reformering af naphthener til aromater. Den består af hydrogen og mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_2 til og med C_4)	649-154-00-6	272-343-6	68814-90-4	K
Gasser (råolie), hydrogenbehandlet, sur petroleum-depentanizer-stabilisatoraftræks-; raffinaderigas (Den sammensatte blanding opnået fra depentanizer-stabiliseringen af hydrogenbehandlet petroleum. Den består primært af hydrogen, methan, ethan og propan med forskellige små mængder af nitrogen, hydrogensulfid, carbonmonoxid og carbonhydrider, overvejende fra C_4 til og med C_5)	649-155-00-1	272-775-5	68911-58-0	K
Gasser (råolie), hydrogenbehandlet, sur petroleum-flashkammer-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra flashkammeret fra enheden, der behandler sur petroleum med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består primært af hydrogen og methan med forskellige små mængder af nitrogen, carbonmonoxid, og carbonhydrider, overvejende fra C_2 til og med C_5)	649-156-00-7	272-776-0	68911-59-1	K
Gasser (råolie), destillat, unifiner-afsvovlingsstripper-aftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding strippet fra væskeproduktet fra unifiner-afsvovlingsprocessen. Den består af hydrogensulfid, methan, ethan og propan)	649-157-00-2	272-873-8	68919-01-7	K

Gasser (råolie), fluidiseret katalytisk krakker-fraktioneringsaftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet ved fraktioneringen af topfraktionsproduktet fra den fluidiserede katalytiske krakningsproces. Den består af hydrogen, hydrogensulfid, nitrogen og carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_5)	649-158-00-8	272-874-3	68919-02-8	K
Gasser (råolie), fluidiseret katalytisk krakkerskrubning, sekundære absorberaftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet ved at skrubbe topfraktionsgassen fra den fluidiserede, katalytiske krakker. Den består af hydrogen, nitrogen, methan, ethan og propan)	649-159-00-3	272-875-9	68919-03-9	K
Gasser (råolie), tungt destillat, hydrogenbehandlerafsvovler-stripperaftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding strippet fra væskeproduktet fra det tunge destillat fra hydrogenbehandler-afsvovlingsprocessen. Den består af hydrogen, hydrogensulfid og mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_5)	649-160-00-9	272-876-4	68919-04-0	K
Gasser (råolie), platformerstabilizer-aftræks-, fraktionering af lette produkter; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået ved fraktioneringen af de lette produkter fra platinreaktorerne fra platformerenheden. Den består af hydrogen, methan, ethan og propan)	649-161-00-4	272-880-6	68919-07-3	K
Gasser (råolie), preflash-tårn-aftræks-, rådestillation; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet fra det første tårn brugt ved destillationen af råolie. Den består af nitrogen og mættede, aliphatiske carbonhydrider,	649-162-00-X	272-881-1	68919-08-4	K

overvejende fra C_1 til og med C_5)				
Gasser (råolie), tjærestripperaftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået ved fraktioneringen af reduceret råolie. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_4)	649-163-00-5	272-884-8	68919-11-9	K
Gasser (råolie), unifiner-stripperaftræks-; raffinaderigas (En blanding af hydrogen og methan opnået ved fraktioneringen af produkterne fra unifiner-enheden)	649-164-00-0	272-885-3	68919-12-0	K
Slutgas (råolie), katalytisk hydroafsvovlet naphthaseparator-; raffinaderigas (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved hydroafsvovlingen af naphtha. Den består af hydrogen, methan, ethan og propan)	649-165-00-6	273-173-5	68952-79-4	K
Slutgas(råolie), straight-run-naphtha-hydroafsvovler-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået ved hydroafsvovlingen af straight-run naphtha. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_5)	649-166-00-1	273-174-0	68952-80-7	K
Gasser (råolie), sponge-absorber-aftræks-, fluidiserede katalytisk krakker- og gasolie-afsvovler-topfraktionsfraktionering; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået ved fraktionering af produkterne fra den flydende katalytiske krakker- og gasolieafsvovler. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_4)	649-167-00-7	273-269-7	68955-33-9	K
Gasser (råolie), rådestillation og katalytisk krakning; raffinaderigas	649-168-00-2	273-563-5	68989-88-8	K

(En sammensat blanding fremstillet ved rå destillation og katalytiske krakningsprocesser. Den består af hydrogen, hydrogensulfid, nitrogen, carbonmonoxid og paraffin- og olefincarbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)				
Gasser (råolie), gasolie-diethanolaminskrubber-aftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding fremstillet ved afsvovling af gasolier med diethanolamin. Den består overvejende af hydrogensulfid, hydrogen og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-169-00-8	295-397-2	92045-15-3	K
Gasser (råolie), gasolie-hydroafsvovling-udløbs-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået ved separation af væskefasen fra udløbet fra hydrogeneringsreaktionen. Den består overvejende af hydrogen, hydrogensulfid og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_3)	649-170-00-3	295-398-8	92045-16-4	K
Gasser (råolie), gasolie-hydroafsvovling-udblæsnings-; raffinaderigas (En sammensat blanding af gasser opnået fra reformeren og fra udblæsningerne fra hydrogeneringsreaktoren. Den består overvejende af hydrogen og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-171-00-9	295-399-3	92045-17-5	K
Gasser (råolie), hydrogenatorudløb-flashkammer-aftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding af gasser opnået fra flashen fra udløbene efter hydrogeneringsreaktionen. Den består overvejende af hydrogen og aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)	649-172-00-4	295-400-7	92045-18-6	K

Gasser (råolie), naphthadampkrakning-højtryksrest-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået som en blanding af de ikke-kondenserbare dele af produktet fra en naphthadampkrakningsproces så vel som restgasser opnået under bearbejdningen af efterfølgende produkter. Den består overvejende af hydrogen og paraffinske og olefinske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5, hvilke kan være blandet med naturgas)	649-173-00-X	295-401-2	92045-19-7	K
Gasser (råolie), restvisbreaking-aftræks-; raffinaderigas (En sammensat blanding opnået fra viskositetsreduktion af rester i en ovn. Den består overvejende af hydrogensulfid og paraffinske og olefinske carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-174-00-5	295-402-8	92045-20-0	K
Foot's oil (råolie), syrebehandlet; solventekstraherede eller afvoksede tunge restolier (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af Foot's oil med svovlsyre. Den består overvejende af forgrenede carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50})	649-175-00-0	300-225-7	93924-31-3	L
Foot's oil (råolie), lerbehandlet; solventekstraherede eller afvoksede tunge restolier (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af Foot's oil med naturligt eller modificeret ler, enten i en kontakt- eller perkolationsproces for at fjerne spor af polære forbindelser og urenheder, som er til stede. Den består overvejende af forgrenede carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50})	649-176-00-6	300-226-2	93924-32-4	L
Gasser (råolie), C_{3-4}-; kulbrintegasser	649-177-00-1	268-629-5	68131-75-9	K

(En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra krakningen af råolie. Den består af carbonhydrider, C_3 til og med C_4, overvejende propan og propylen, med kogeinterval omtrent fra − 51 °C til − 1 °C)				
Slutgas (råolie), katalytisk krakket destillat- og katalytisk krakket naphtha-fraktioneringsabsorber-; kulbrintegasser (Den sammensatte blanding af carbonhydrider fra destillationen af produkterne fra katalytisk krakkede destillater og katalytisk krakket naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, C_1 til og med C_4)	649-178-00-7	269-617-2	68307-98-2	K
Slutgas (råolie), katalytisk polymeriseringsnaphtha-fraktioneringsstabilizer-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fra fraktioneringsstabiliseringsprodukterne fra polymerisering af naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, C_1 til og med C_4)	649-179-00-2	269-618-8	68307-99-3	K
Slutgas (råolie), katalytisk reformeret naphtha-fraktioneringsstabilizer-, hydrogensulfidfri; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringsstabilisering af katalytisk reformeret naphtha, og fra hvilken hydrogensulfid er blevet fjernet ved aminbehandling. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-180-00-8	269-619-3	68308-00-9	K
Slutgas (råolie), krakket destillat-hydrogenbehandler-stripper; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle termisk krakkede destillater med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af	649-181-00-3	269-620-9	68308-01-0	K

mættede carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)				
Slutgas (råolie), straight-run-destillat-hydroafsvovler-, hydrogensulfidfri; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved katalytisk hydroafsvovling af straight-run-destillater, og fra hvilken hydrogensulfid er blevet fjernet ved aminbehandling. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-182-00-9	269-630-3	68308-10-1	K
Slutgas (råolie), katalytisk gasoliekraknings-absorber-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af produkter fra den katalytiske krakning af gasolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-183-00-4	269-623-5	68308-03-2	K
Slutgas (råolie), gasgenudvindingsanlægs-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af produkter fra diverse carbonhydridstrømme. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-184-00-X	269-624-0	68308-04-3	K
Slutgas (råolie), gasgenudvindingsanlæg-deethanizer-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af produkter fra diverse carbonhydridstrømme. Den består af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-185-00-5	269-625-6	68308-05-4	K
Slutgas (råolie), hydroafsvovlet destillat- og hydroafsvovlet naphtha-fraktioneringskolonne-, syrefri;	649-186-00-0	269-626-1	68308-06-5	K

kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering af hydroafsvovlet naphtha og destillatcarbonhydridstrømme og behandlet for at fjerne sure urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)				
Slutgas (råolie), hydroafsvovlet vakuumgasolie-stripper-, hydrogensulfidfri; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved stripningsstabilisering af katalytisk hydroafsvovlet vakuumgasolie og fra hvilken hydrogensulfid er blevet fjernet ved aminbehandling. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)	649-187-00-6	269-627-7	68308-07-6	K
Slutgas (råolie), let straight-run-naphtha-stabilizer-, hydrogensulfidfri; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringsstabilisering af straight-run-naphtha, og fra hvilken hydrogensulfid er blevet fjernet ved aminbehandling. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_5)	649-188-00-1	269-629-8	68308-09-8	K
Slutgas (råolie), propan- og propylenalkyleringsføde-forarbejdningsdeethanizer-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af produkterne fra reaktionen mellem propan og propylen. Den består af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-189-00-7	269-631-9	68308-11-2	K
Slutgas (råolie), vakuumgasolie-hydroafsvovler-, hydrogensulfidfri; kulbrintegasser	649-190-00-2	269-632-4	68308-12-3	K

(En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved katalytisk hydroafsvovling af vakuumgasolie, og fra hvilken hydrogensulfid er blevet fjernet ved aminbehandling. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_6)				
Gasser (råolie), katalytisk krakkede topfraktioner; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkter fra den katalytiske krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_5, med kogeinterval omtrent fra − 48 °C til 32 °C)	649-191-00-8	270-071-2	68409-99-4	K
Alkaner, C_{1-2-}; kulbrintegasser	649-193-00-9	270-651-5	68475-57-0	K
Alkaner, C_{2-3-}; kulbrintegasser	649-194-00-4	270-652-0	68475-58-1	K
Alkaner, C_{3-4-}; kulbrintegasser	649-195-00-X	270-653-6	68475-59-2	K
Alkaner, C_{4-5-}; kulbrintegasser	649-196-00-5	270-654-1	68475-60-5	K
Brændselsgasser; kulbrintegasser (En blanding af lette gasser. Den består overvejende af hydrogen og/eller lavmolekylære carbonhydrider)	649-197-00-0	270-667-2	68476-26-6	K
Brændselsgasser, råoliedestillater; kulbrintegasser (En sammensat blanding af lette gasser fremstillet ved destillation af råolie ved katalytisk reformering af naphtha. Den består af hydrogen og carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4, med kogeinterval omtrent fra − 217 °C til − 12 °C)	649-198-00-6	270-670-9	68476-29-9	K
Carbonhydrider, C_{3-4-}; kulbrintegasser	649-199-00-1	270-681-9	68476-40-4	K
Carbonhydrider, C_{4-5-}; kulbrintegasser	649-200-00-5	270-682-4	68476-42-6	K
Carbonhydrider, C_{2-4-}, C_3-rige; kulbrintegasser	649-201-00-0	270-689-2	68476-49-3	K

Råoliegasser, fortættede; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_7, med kogeinterval omtrent fra − 40 °C til 80 °C)	649-202-00-6	270-704-2	68476-85-7	K
Råoliegasser, fortættede, sweetenede; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste en fortættet råoliegasblanding en sweetening-proces for at omdanne mercaptaner eller for at fjerne sure urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_7, med kogeinterval omtrent fra − 40 °C til 80 °C)	649-203-00-1	270-705-8	68476-86-8	K
Gasser (råolie), C_{3-4}-, isobutanrige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af mættede og umættede carbonhydrider, sædvanligvis C_3 til og med C_6, overvejende butan og isobutan. Den består af mættede og umættede carbonhydrider, C_3 til og med C_4, overvejende isobutan)	649-204-00-7	270-724-1	68477-33-8	K
Destillater (råolie), C_{3-6}-, piperylenrige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af mættede og umættede, aliphatiske carbonhydrider, sædvanligvis C_3 til og med C_6. Den består af mættede og umættede carbonhydrider, C_3 til og med C_6, overvejende piperylener)	649-205-00-2	270-726-2	68477-35-0	K
Gasser (råolie), butansplitter-topfraktioner; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af butanstrømmen. Den	649-206-00-8	270-750-3	68477-69-0	K

består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_4)				
Gasser (råolie), C_{2-3}-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkter fra en katalytisk fraktioneringsproces. Den indeholder overvejende ethan, ethylen, propan og propylen)	649-207-00-3	270-751-9	68477-70-3	K
Gasser (råolie), katalytisk krakket gasolie-depropanizer-bundfraktioner, C_4-rige, syrefri; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering af katalytisk krakket gasoliecarbonhydridstrøm og behandlet for at fjerne hydrogensulfid og andre sure komponenter. Den består af carbonhydrider, C_3 til og med C_5, overvejende C_4)	649-208-00-9	270-752-4	68477-71-4	K
Gasser (råolie), katalytisk krakket naphtha-debutanizer-bundfraktioner, C_{3-5}-rige; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved stabilisering af katalytisk krakket naphtha. Den består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_5)	649-209-00-4	270-754-5	68477-72-5	K
Slutgas (råolie), isomeriseret naphtha-fraktioneringsstabilizer-; kulbrintegasser (En sammensat blanding af carbonhydrider udvundet fra produkter fra fraktioneringsstabiliseringen af isomeriseret naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_1 til og med C_4)	649-210-00-X	269-628-2	68308-08-7	K
Foot's oil (råolie), carbonbehandlet; solventekstraherede eller afvoksede tunge restolier (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved	649-211-00-5	308-126-0	97862-76-5	L

behandlingen af Foot's oil med aktivt kul for at fjerne sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede ligekædede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})				
Destillater (råolie), sweetenede, middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste et råoliedestillat en sweetening-proces for at omdanne mercaptaner eller fjerne sure urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 345 °C)	649-212-00-0	265-088-7	64741-86-2	N
Gasolier (råolie), solventraffinerede; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består overvejende af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 400 °C)	649-213-00-6	265-092-9	64741-90-8	N
Destillater (råolie), solventraffinerede middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består overvejende af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 345 °C)	649-214-00-1	265-093-4	64741-91-9	N
Gasolier (råolie), syrebehandlede; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svolvsyrebehandlingsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 230 °C til 400 °C)	649-215-00-7	265-112-6	64742-12-7	N
Destillater (råolie), syrebehandlede,	649-216-00-2	265-113-1	64742-13-8	N

middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svovlsyrebehandlingsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 345 °C)				
Destillater (råolie), syrebehandlede, lette; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svovlsyrebehandlingsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{16}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 290 °C)	649-217-00-8	265-114-7	64742-14-9	N
Gasolier (råolie), kemisk neutraliserede; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en behandlingsproces til fjernelse af sure materialer. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 230 °C til 400 °C)	649-218-00-3	265-129-9	64742-29-6	N
Destillater (råolie), kemisk neutraliserede, middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en behandlingsproces for at fjerne sure materialer. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 345 °C)	649-219-00-9	265-130-4	64742-30-9	N
Destillater (råolie), lerbehandlede, middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af råoliefraktion med naturligt eller modificeret ler, i enten en kontrakt- eller perkoleringsproces, til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og tilstedeværende	649-220-00-4	265-139-3	64742-38-7	N

urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 345 °C)				
Destillater (råolie), hydrogenbehandlede, middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 400 °C)	649-221-00-X	265-148-2	64742-46-7	N
Gasolier (råolie), hydroafsvovlede; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en rå råolie ved behandling med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, der fjernes. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 230 °C til 400 °C)	649-222-00-5	265-182-8	64742-79-6	N
Destillater (råolie), hydroafsvovlede, middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en rå råolie ved behandling med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, der fjernes. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 400 °C)	649-223-00-0	265-183-3	64742-80-9	N
Destillater (råolie), katalytisk reformer-fraktioneringskolonnerest, højtkogende; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af en rest fra en katalytisk reformer-fraktioneringskolonne. Den koger omtrent fra 343 °C til 399 °C)	649-228-00-8	270-719-4	68477-29-2	N

Destillater (råolie), katalytisk reformer-fraktioneringskolonnerest, intermediært kogende; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af en rest fra en katalytisk reformer-fraktioneringskolonne. Den koger omtrent fra 288 °C til 371 °C)	649-229-00-3	270-721-5	68477-30-5	N
Destillater (råolie), katalytisk reformer-fraktioneringskolonnerest, lavtkogende; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af en rest fra en katalytisk reformer-fraktioneringskolonne. Den koger omtrent under 288 °C)	649-230-00-9	270-722-0	68477-31-6	N
Destillater (råolie), højt raffinerede, middeltunge; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste en råoliefraktion flere af følgende trin: filtrering, centrifugering, atmosfærisk destillation, vakuumdestillation, syrebehandling, neutralisation og lerbehandling. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{10} til og med C_{20})	649-231-00-4	292-615-8	90640-93-0	N
Destillater (råolie), katalytisk reformer-, tungt, aromatisk koncentrat; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra destillation af en katalytisk reformeret råoliefraktion. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{10} til og med C_{16}, med kogeinterval omtrent fra 200 °C til 300 °C)	649-232-00-X	295-294-2	91995-34-5	N
Gasolier, paraffin-; uspecificeret gasolie (Et destillat opnået ved redestillationen af en sammensat blanding af carbonhydrider, opnået ved	649-233-00-5	300-227-8	93924-33-5	N

destillationen af spildevandet fra kraftig, katalytisk hydrogenbehandling af paraffiner. Det har kogeinterval omtrent fra 190 °C til 330 °C)				
Naphtha (råolie), solvent-raffineret, hydroafsvovlet, tung; uspecificeret gasolie	649-234-00-0	307-035-3	97488-96-5	N
Carbonhydrider, C_{16-20}-hydrogenbehandlet, middeltungt destillat, lette destillater; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som forløb fra vakuumdestillationen af udløb fra behandlingen af et middeltungt destillat med hydrogen. Den består overvejende af carbonhydrider C_{16} til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 290 °C til 350 °C. Den danner en færdig olie med en viskositet på ~~2 cSt ved 100 °C~~ ⌦ 2 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 100 °C ⌫)	649-235-00-6	307-659-6	97675-85-9	N
Carbonhydrider, C_{12-20}-, hydrogenbehandlet, paraffin, lette destillater; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som forløb fra vakuumdestillationen af udløb fra behandlingen af tunge paraffiner med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende fra C_{12} til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 230 °C til 350 °C. Den danner en færdig olie med en viskositet på ~~2 cSt ved 100 °C~~ ⌦ 2 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 100 °C ⌫)	649-236-00-1	307-660-1	97675-86-0	N
Carbonhydrider, C_{11-17}-solvent-ekstraherede, lette, naphthenske; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved ekstraktionen af aromaterne fra et let naphthendestillat med en viskositet på ~~2,2 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 2,2 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫ . Den består overvejende af	649-237-00-7	307-757-9	97722-08-2	N

carbonhydrider, overvejende fra C_{11} til og med C_{17}, med kogeinterval omtrent fra 200 °C til 300 °C)				
Gasolier, hydrogenbehandlede; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved redestillationen af udløbene fra behandlingen af paraffiner med hydrogen, i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende fra C_{17} til og med C_{27}, med kogeinterval omtrent fra 330 °C til 340 °C)	649-238-00-2	308-128-1	97862-78-7	N
Destillater (råolie), carbonbehandlede lette paraffin-; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af en råoliefraktion med aktivt kul til fjernelse af spor af polære bestanddele og urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider overvejende C_{12} til og med C_{28})	649-239-00-8	309-667-5	100683-97-4	N
Destillater (råolie), intermediære paraffin-, carbonbehandlede; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af råolie med aktivt kul, til fjernelse af spor af polære bestanddele og urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{16} til og med C_{36})	649-240-00-3	309-668-0	100683-98-5	N
Destillater (råolie), intermediære paraffin-, lerbehandlede; uspecificeret gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af råolie med blegejord til fjernelse af spor af polære bestanddele og urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{16} til og med C_{36})	649-241-00-9	309-669-6	100683-99-6	N

Alkaner, C_{12-26}-forgrenede og ligekædede	649-242-00-4	292-454-3	90622-53-0	N
Smørefedtstoffer; fedt (En sammensat blanding af carbonhydrider, overvejende C_{12} til og med C_{50}, som kan indeholde organiske salte af alkalimetaller, jordalkalimetaller, og/eller aluminiumforbindelser)	649-243-00-X	278-011-7	74869-21-9	N
Slack wax (råolie); råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en råoliefraktion ved solventkrystallisation (solventafvoksning), eller som en destillationsfraktion fra en meget voksagtig olie. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{20})	649-244-00-5	265-165-5	64742-61-6	N
Slack wax (råolie), syrebehandlet; råparaffin (En sammensat blanding ekstraktcarbonhydrider opnået som et raffinat ved behandling af en råolie-slack wax i en svovlsyrebehandlingsproces. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{20})	649-245-00-0	292-659-8	90669-77-5	N
Slack wax (råolie), lerbehandlet; råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af en råolie-slack wax-fraktion med neutralt eller modificeret ler i enten en kontakt- eller en perkoleringsproces. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{20})	649-246-00-6	292-660-3	90669-78-6	N
Slack wax (råolie), hydrogenbehandlet; råparaffin	649-247-00-1	295-523-6	92062-09-4	N

(En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle slack wax med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{20})				
Slack wax (råolie), lavtsmeltende; råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en råoliefraktion ved solventafparaffinering. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	649-248-00-7	295-524-1	92062-10-7	N
Slack wax (råolie), lavtsmeltende, hydrogenbehandlet; råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af lavtsmeltende råolie-slack wax med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	649-249-00-2	295-525-7	92062-11-8	N
Slack wax (råolie), lavtsmeltende, carbonbehandlet; råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af lavtsmeltende slack wax med aktivt kul for at fjerne polære sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	649-250-00-8	308-155-9	97863-04-2	N
Slack wax (råolie), lavtsmeltende, lerbehandlet; råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af lavtsmeltende råolie-slack wax med bentonit for at fjerne polære sporbestanddele og urenheder.	649-251-00-3	308-156-4	97863-05-3	N

Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})				
Slack wax (råolie), lavtsmeltende, kiselsyrebehandlet; råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af lavtsmeltende råolie-slack wax med kiselsyre for at fjerne polære sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede, ligekædede og forgrenede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	649-252-00-9	308-158-5	97863-06-4	N
Slack wax (råolie), carbonbehandlet; råparaffin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af råolie-slack wax med aktivt kul for at fjerne spor af polære bestanddele og urenheder)	649-253-00-4	309-723-9	100684-49-9	N
Vaselin; vaselin (En sammensat blanding af carbonhydrider udvundet som et halvfast stof fra afvoksning af paraffinrestolie. Den består overvejende af mættede krystallinske og flydende carbonhydrider, overvejende større end C_{25})	649-254-00-X	232-373-2	8009-03-8	N
Vaselin (råolie), oxideret; vaselin (En sammensat blanding af organiske forbindelser, overvejende højmolekylære carboxylsyrer, opnået ved luftoxidation af vaselin)	649-255-00-5	265-206-7	64743-01-7	N
Vaselin (råolie), aluminiumoxidbehandlet; vaselin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået, når vaselin er behandlet med AL2 O3 for at fjerne polære komponenter og urenheder. Den består overvejende af mættede,	649-256-00-0	285-098-5	85029-74-9	N

krystalliske og flydende carbonhydrider, overvejende større end C_{25})				
Vaselin (råolie), hydrogenbehandlet; vaselin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et halvfast stof fra afvokset paraffinrestolie behandlet med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af mættede mikrokrystallinske og flydende carbonhydrider, overvejende større end C_{20})	649-257-00-6	295-459-9	92045-77-7	N
Vaselin (råolie) carbonbehandlet; vaselin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af råolievaselin med aktivt kul for at fjerne polære sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende større end C_{20})	649-258-00-1	308-149-6	97862-97-0	N
Vaselin (råolie), kiselsyrebehandlede; vaselin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af råolievaselin med kiselsyre for at fjerne polære sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende større end C_{20})	649-259-00-7	308-150-1	97862-98-1	N
Vaselin (råolie), lerbehandlet; vaselin (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af vaselin med blegejord for at fjerne spor af polære bestanddele og urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende større end C_{25})	649-260-00-2	309-706-6	100684-33-1	N
Kondensat, naturgas-; lavtkogende	649-261-00-8	232-349-1	8006-61-9	P

nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider adskilt fra naturgas ved processer, såsom nedkøling eller absorption. Den består overvejende af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_8, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 120 °C)				
Naphtha; lavtkogende nafta (Raffinerede, delvist raffinerede, eller uraffinerede råolieprodukter fremstillet ved destillation af naturgas. De består af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_6, med kogeinterval omtrent fra 100 °C til 200 °C)	649-262-00-3	232-443-2	8030-30-6	P
Ligroin; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneret destillation af råolie. Denne fraktion har kogeinterval omtrent fra 20 °C til 135 °C)	649-263-00-9	232-453-7	8032-32-4	P
Naphtha (råolie), tung straight-run-; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 65 °C til 230 °C)	649-264-00-4	265-041-0	64741-41-9	P
Naphtha (råolie), full-range straight-run-; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 220 °C)	649-265-00-X	265-042-6	64741-42-0	P
Naphtha (råolie), let straight-run-; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af	649-266-00-5	265-046-8	64741-46-4	P

carbonhydrider fremstillet ved destillation af råolie. Den består overvejende af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 180 °C)				
Solventnaphtha (råolie), let aliphatisk; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af råolie eller naturgaskondensat. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 160 °C)	649-267-00-0	265-192-2	64742-89-8	P
Destillater (råolie), straight-run, lette; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af råolie. Den består af carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_7, med kogeinterval omtrent fra −88 °C til 99 °C)	649-268-00-6	270-077-5	68410-05-9	P
Benzin, damp-genudvindings-; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider separeret fra gasserne fra damp-genudvindingssystemet ved afkøling. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 196 °C)	649-269-00-1	271-025-4	68514-15-8	P
Benzin, straight-run-, topanlæg; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet fra topanlægget ved destillationen af råolie. Den koger i intervallet omtrent fra 36,1 °C til 193,3 °C)	649-270-00-7	271-727-0	68606-11-1	P
Naphtha (råolie), ikke-sweetenet; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af	649-271-00-2	272-186-3	68783-12-0	P

carbonhydrider fremstillet ved destillationen af naphthastrømme fra forskellige raffinaderiprocesser. Den består af carbonhydrider, overvejende fra C_5 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 0 °C til 230 °C)				
Destillater (råolie), fraktionering af let straight-run-benzin stabilizertopfraktioner; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af let straight-run-benzin. Den består af mættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_3 til og med C_6)	649-272-00-8	272-931-2	68921-08-4	P
Naphtha (råolie), tung straight-run-, aromatholdig; lavtkogende nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en destillationsproces af rå råolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_8 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 130 °C til 210 °C)	649-273-00-3	309-945-6	101631-20-3	P
Naphtha (råolie), full-range alkylat-; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra reaktionen mellem isobutan og monoolefinske carbonhydrider, sædvanligvis C_3 til og med C_5. Den består af overvejende forgrenede, mættede carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 90 °C til 220 °C)	649-274-00-9	265-066-7	64741-64-6	P
Naphtha (råolie), tung alkylat-; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra reaktionen mellem isobutan og monoolefinske carbonhydrider,	649-275-00-4	265-067-2	64741-65-7	P

sædvanligvis C_3 til og med C_5. Den består af overvejende forgrenede, mættede carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 220 °C)				
Naphtha (råolie), let alkylat-; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra reaktionen mellem isobutan og monoolefinske carbonhydrider, sædvanligvis C_3 til og med C_5. Den består af overvejende forgrenede, mættede carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 90 °C til 160 °C)	649-276-00-X	265-068-8	64741-66-8	P
Naphtha (råolie), isomeriserings-; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk isomerisering af ligekædede paraffincarbonhydrider, C_4 til og med C_6. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, såsom isobutan, isopentan, 2,2-dimethylbutan, 2-methylpentan og 3-methylpentan)	649-277-00-5	265-073-5	64741-70-4	P
Naphtha (råolie), solventraffineret let; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består overvejende af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 190 °C)	649-278-00-0	265-086-6	64741-84-0	P
Naphtha (råolie), solventraffineret, tung; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består overvejende af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra	649-279-00-6	265-095-5	64741-92-0	P

90 °C til 230 °C)				
Raffinater (råolie), katalytisk, reformer-ethylenglycol-vand-modstrømsekstrakter; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra UDEX-ekstraktionsprocessen af den katalytiske reformerstrøm. Den består af mættede carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_9)	649-280-00-1	270-088-5	68410-71-9	P
Raffinater (råolie), reformer-, Lurgi-enhedsseparerede; lavtkogende modificeret nafta (Den sammensatte blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en Lurgi-separationsenhed. Den består overvejende af ikke-aromatiske carbonhydrider med varierende små mængder aromatiske carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_8)	649-281-00-7	270-349-3	68425-35-4	P
Naphtha (råolie), full-range-alkylat-, butanholdig; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra reaktion mellem isobutan og monoolefinske carbonhydrider, sædvanligvis C_3 til og med C_5. Den består af overvejende forgrenede, mættede carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med nogle butaner, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 200 °C)	649-282-00-2	271-267-0	68527-27-5	P
Destillater (råolie), naphtha-, dampkrakningsudvundne, solventraffinerede, lette, hydrogenbehandlede; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinaterne fra en solventekstraktionsproces af et hydrogenbehandlet let destillat fra	649-283-00-8	295-315-5	91995-53-8	P

dampkrakket naphtha)				
Naphtha (råolie), C_{4-12}-, butanalkylat-, isocetan-rig; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved alkylering af butaner. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{12}, rig på isooctan, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 210 °C)	649-284-00-3	295-430-0	92045-49-3	P
Carbonhydrider, hydrogenbehandlede, lette naphthadestillater, solventraffinerede; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra destillationen af hydrogenbehandlet naphtha, efterfulgt af en solventekstraktions- og destillationsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, med kogeinterval omtrent fra 94 °C til 99 °C)	649-285-00-9	295-436-3	92045-55-1	P
Naphtha (råolie), isomerisation, C_6-fraktion; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af en benzin, der er blevet katalytisk isomeriseret. Den består overvejende af hexanisomerer, med kogeinterval omtrent fra 60 °C til 66 °C)	649-286-00-4	295-440-5	92045-58-4	P
Carbonhydrider, C_{6-7}-, naphtha-krakning, solventraffinerede; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved sorptionen af benzen fra en katalytisk, fuldt hydrogeneret, benzin-rig carbonhydridfraktion, der var destillativt opnået fra præhydrogeneret, krakket naphtha. Den består overvejende af paraffin- og naphthencarbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_7, med kogeinterval	649-287-00-X	295-446-8	92045-64-2	P

omtrent fra 70 °C til 100 °C)				
Carbonhydrider, C_6-rige, hydrogenbehandlede, lette naphthadestillater, solventraffinerede; lavtkogende modificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af hydrogenbehandlet naphtha, efterfulgt af solventekstraktion. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, med kogeinterval omtrent fra 65 °C til 70 °C)	649-288-00-5	309-871-4	101316-67-0	P
Naphtha (råolie), tung, katalytisk krakket; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra en katalytisk, krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 65 °C til 230 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del umættede carbonhydrider)	649-289-00-0	265-055-7	64741-54-4	P
Naphtha (råolie), let katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 190 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del umættede carbonhydrider)	649-290-00-6	265-056-2	64741-55-5	P
Carbonhydrider, $C_{3\text{-}11}$-, katalytisk krakket, destillater; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationer af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_{11}, og koger omtrent op til 204	649-291-00-1	270-686-6	68476-46-0	P

°C)				
Naphtha(råolie), katalytisk krakket, let destilleret; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende fra C_1 til og med C_5)	649-292-00-7	272-185-8	68783-09-5	P
Destillater (råolie), naphtha-, dampkrakningsudvundne, hydrogenbehandlede, lette, aromatiske; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle et let destillat fra dampkrakket naphtha. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider)	649-293-00-2	295-311-3	91995-50-5	P
Naphtha (råolie), tung, katalytisk krakket, sweetenet; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste et katalytisk krakket råoliedestillat en sweeteningproces for at omdanne mercaptaner eller fjerne sure urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 60 °C til 200 °C)	649-294-00-8	295-431-6	92045-50-6	P
Naphtha (råolie), let katalytisk krakket, sweetenet; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste naphtha fra en katalytisk krakningsproces en sweetening-proces for at omdanne merceptaner eller fjerne sure urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 210 °C)	649-295-00-3	295-441-0	92045-59-5	P
Carbonhydrider, C_{8-12}-, katalytisk	649-296-00-9	295-794-0	92128-94-4	P

krakning, kemisk neutraliserede; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af en fraktion fra den katalytiske krakningsproces, der er undergået en alkalisk vask. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_8 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 130 °C til 210 °C)				
Carbonhydrider, C_{8-12}-, katalytisk krakket, destillater; lavtkogende, katalytisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_8 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 140 °C til 210 °C)	649-297-00-4	309-974-4	101794-97-2	P
Carbonhydrider, C_{8-12}-, katalytisk kraknings-, kemisk neutraliserede, befriede for svovl; lavtkogende katalytisk krakket nafta	649-298-00-X	309-987-5	101896-28-0	P
Naphtha (råolie), let katalytisk reformeret; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet fra destillation af produkterne fra en katalytisk reformeringsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 190 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del aromatiske og forgrenede carbonhydrider. Denne strøm kan indeholde 10 volumenprocent, eller mere, benzen)	649-299-00-5	265-065-1	64741-63-5	P
Naphtha(råolie), tung katalytisk reformeret; lavtkogende katalytisk reformeret nafta	649-300-00-9	265-070-9	64741-68-0	P

(En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra en katalytisk reformeringsproces. Den består af overvejende aromatiske carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 90 °C til 230 °C)				
Destillater (råolie), katalytisk reformerede depentanizer-; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af produkterne fra en katalytisk reformeringsproces. Den består overvejende af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_6, med kogeinterval omtrent fra −49 °C til 63 °C)	649-301-00-4	270-660-4	68475-79-6	P
Carbonhydrider, C_{2-6}-, C_{6-8}-katalytisk reformer; lavtkogende katalytisk reformeret nafta	649-302-00-X	270-687-1	68476-47-1	P
Rester (råolie), C_{6-8}-, katalytisk reformer-; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat remanens fra den katalytiske reformering af C_{6-8}-føde. Den består af carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_6)	649-303-00-5	270-794-3	68478-15-9	P
Naphtha (råolie), let katalytisk reformeret, aromatfri; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af produkterne fra en katalytisk reformeringsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_8, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 120 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del forgrenede carbonhydrider, hvorfra de aromatiske komponenter er fjernet)	649-304-00-0	270-993-5	68513-03-1	P
Destillater (råolie), katalytisk	649-305-00-6	271-008-1	68513-63-3	P

reformeret straight-run naphtha topfraktioner; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved den katalytiske reformering af straight-run naphtha, efterfulgt af fraktionering af det totale udløb. Den består af mættede, aliphaliske carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_6)				
Råolieprodukter, hydrofiner-powerformer reformater; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (Den sammensatte blanding af carbonhydrider, opnået ved en hydrofiner-powerformer-proces, med kogeinterval omtrent fra 27 °C til 210 °C)	649-306-00-1	271-058-4	68514-79-4	P
Naphtha (råolie), full-range reformeret; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en katalytisk reformeringsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende fra C_5 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 230 °C)	649-307-00-7	272-895-8	68919-37-9	P
Naphtha(råolie), katalytisk reformeret; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkter fra en katalytisk reformeringsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 220 °C. Den indeholder en relativ stor mængde af aromatiske og forgrenede carbonhydrider. Denne strøm kan indeholde 10 volumenprocent, eller mere, benzen)	649-308-00-2	273-271-8	68955-35-1	P
Destillater (råolie), katalytiske reformerede hydrogenbehandlede lette, C_{8-12}-aromatfraktion; lavtkogende	649-309-00-8	285-509-8	85116-58-1	P

katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af alkylbenzener opnået ved katalytisk reformering af råolienafta. Den består overvejende af alkylbenzener, overvejende C_8 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 160 °C til 180 °C)				
Aromatiske carbonhydrider, C_8-, katalytisk reformeringsudvundede; lavtkogende katalytisk reformeret nafta	649-310-00-3	295-279-0	91995-18-5	P
Aromatiske carbonhydrider, C_{7-12}-, C_8-rige; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved separation fra den platformatholdige fraktion. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12} (primært C_8) og kan indeholde ikke-aromatiske carbonhydrider, begge med kogeinterval omtrent fra 130 °C til 200 °C)	649-311-00-9	297-401-8	93571-75-6	P
Benzin, C_{5-11}, højoktan stabiliseret reformeret; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat højoktanblanding af carbonhydrider opnået ved katalytisk dehydrogenering af en overvejende naphthensk naphtha. Den består af aromater og ikke-aromater, overvejende C_5 til og med C_{11} med kogeinterval omtrent fra 45 °C til 185 °C)	649-312-00-4	297-458-9	93572-29-3	P
Carbonhydrider, C_{7-12}, C ⌦ > ⌫ $_9$-aromatrige, reformering, tung fraktion; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved separation fra den platformatholdige fraktion. Den består overvejende af ikke-aromatiske carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval 120 °C til 210 °C samt, C_9 og højere aromatiske carbonhydrider)	649-313-00-X	297-465-7	93572-35-1	P

Carbonhydrider, C_{5-11}-, ikke-aromatrige, reformering, let fraktion; lavtkogende katalytisk reformeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved separation fra den platformatholdige fraktion. Den består overvejende af ikke-aromatiske carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 125 °C, benzen og toluen)	649-314-00-5	297-466-2	93572-36-2	P
Foots oil (råolie), kiselsyrebehandlet; solventekstraherede eller afvoksede tunge restolier (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af Foots oil med kiselsyre for at fjerne sporbestanddele og urenheder. Den består overvejende af mættede ligekædede carbonhydrider, overvejende større end C_{12})	649-315-00-0	308-127-6	97862-77-6	L
Naphtha (råolie), let termisk krakket; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_8, med kogeinterval omtrent fra −10 °C til 130 °C)	649-316-00-6	265-075-6	64741-74-8	P
Naphtha (råolie), tung termisk krakket; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 65 °C til 220 °C)	649-317-00-1	265-085-0	64741-83-9	P
Destillater (råolie), tunge aromatiske; lavtkogende termisk krakket nafta (Den sammensatte blanding af	649-318-00-7	267-563-4	67891-79-6	P

carbonhydrider opnået ved destillationen af produkterne fra den termiske krakning af ethan og propan. Denne højerekogende fraktion består overvejende af aromatiske C_5-C_7-carbonhydrider med nogle umættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_5. Denne strøm kan indeholde benzen)				
Destillater (råolie), lette aromatiske; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af produkterne fra den termiske krakning af ethan og propan. Denne laverekogende fraktion består overvejende af aromatiske C_5-C_7-carbonhydrider med nogle umættede aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_5. Denne strøm kan indeholde benzen)	649-319-00-2	267-565-5	67891-80-9	P
Destillater (råolie), naphtha- og raffinatpyrolysatafledte, benzinblanding; lavtkogende termisk krakket nafta (Den sammensatte blanding af carbonhydrider opnået ved pyrolysefraktionering ved 816 °C af naphtha og raffinat. Den består overvejende af C_9-carbonhydrider og koger omtrent ved 204 °C)	649-320-00-8	270-344-6	68425-29-6	P
Aromatiske carbonhydrider, C_{6-8}, naphtha- og raffinatpyrolysatudvundne; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringspyrolyse ved 816 °C af naphtha og raffinat. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_8, herunder benzen)	649-321-00-3	270-658-3	68475-70-7	P
Destillater (råolie), termisk krakket naphtha og gasolie; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved	649-322-00-9	271-631-9	68603-00-9	P

destillationen af termisk krakket naphtha og/eller gasolie. Den består overvejende af olefinske carbonhydrider med carbonantal C_5, med kogeinterval omtrent fra 33 °C til 60 °C)				
Destillater (råolie), termisk krakket naphtha og gasolie, C_5-dimer-holdige; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved den ekstraktive destillation af termisk krakket naphtha og/eller gasolie. Den består overvejende af C_5-carbonhydrider med nogle dimeriserede C_5-olefiner, og har kogeinterval omtrent fra 33 °C til 184 °C)	649-323-00-4	271-632-4	68603-01-0	P
Destillater (råolie), termisk krakket naphtha og gasolie, ekstraktive; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved den ekstraktive destillation af termisk krakket naphtha og/eller gasolie. Den består af paraffinske og olefinske carbonhydrider, overvejende isoamylener, såsom 2-methyl-1-buten og 2-methyl-2-buten, med kogeinterval omtrent fra 31 °C til 40 °C)	649-324-00-X	271-634-5	68603-03-2	P
Destillater (råolie), let termisk krakkede, debutanizerede aromatiske; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, primært benzen)	649-325-00-5	273-266-0	68955-29-3	P
Naphtha (råolie), let termisk krakket sweetenet; lavtkogende termisk krakket nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste et råoliedestillat, fra den	649-326-00-0	295-447-3	92045-65-3	P

højtemperaturstermiske krakning af tunge oliefraktioner, en sweetening-proces for at omdanne mercaptaner. Den består overvejende af aromater, olefiner og mættede carbonhydrider med kogeinterval omtrent fra 20 °C til 100 °C)				
Naphtha (råolie), hydrogenbehandlet tung; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{13}, med kogeinterval omtrent fra 65 °C til 230 °C)	649-327-00-6	265-150-3	64742-48-9	P
Naphtha (råolie), hydrogenbehandlet let; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval fra −20 °C til 190 °C)	649-328-00-1	265-151-9	64742-49-0	P
Naphtha (råolie), hydroafsvovlet let; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk hydroafsvovlingsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 190 °C)	649-329-00-7	265-178-6	64742-73-0	P
Naphtha (råolie), hydroafsvovlet tung; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk hydroafsvovlningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 90 °C til 230 °C)	649-330-00-2	265-185-4	64742-82-1	P
Destillater (råolie), hydrogenbehandlede middeltunge,	649-331-00-8	270-092-7	68410-96-8	P

intermediært kogende; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af produkter fra en hydrogenbehandlingsproces af middeltunge destillater. Den består af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 127 °C til 188 °C)				
Destillater (råolie), let destillat hydrogenbehandlingsproces-, lavtkogende; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af produkter fra hydrogenbehandlingsprocessen af en let destillat. Den består af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_9, med kogeinterval omtrent fra 3 °C til 194 °C)	649-332-00-3	270-093-2	68410-97-9	P
Destillater (råolie), hydrogenbehandlet tung naphtha, deisohexanizer-topfraktioner; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af produkterne fra en hydrogenbehandlingsproces af tung naphtha. Den består af carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_6, med kogeinterval omtrent fra −49 °C til 68 °C)	649-333-00-9	270-094-8	68410-98-0	P
Solventnaphtha (råolie), let aromatisk, hydrogenbehandlet; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_8 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra	649-334-00-4	270-988-8	68512-78-7	P

135 °C til 210 °C)				
Naphtha (råolie), hydroafsvovlet termisk krakket let; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering af et hydroafsvovlet termisk krakket destillat. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 23 °C til 195 °C)	649-335-00-X	285-511-9	85116-60-5	P
Naphtha (råolie), hydrogenbehandlet let, cycloalkanholdig; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af en råoliefraktion. Den består overvejende af alkaner og cycloalkaner med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 190 °C)	649-336-00-5	285-512-4	85116-61-6	P
Naphtha (råolie), tung dampkrakket, hydrogeneret; lavtkogende hydrogeneret nafta	649-337-00-0	295-432-1	92045-51-7	P
Naphtha (råolie), hydroafsvovlet full-range; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en katalytisk hydroafsvovlingsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 250 °C)	649-338-00-6	295-433-7	92045-52-8	P
Naphtha (råolie), hydrogenbehandlet let dampkrakket; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion, fremkommet ved en pyrolyseproces, med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende C_5 til og	649-339-00-1	295-438-4	92045-57-3	P

med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 190 °C)				
Carbonhydrider, C_{4-12}, naphtha-krakning, hydrogenbehandlede; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af produktet fra en naphtha-dampkrakningsproces og efterfølgende selektiv katalytisk hydrogenering af gummidannere. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 230 °C)	649-340-00-7	295-443-1	92045-61-9	P
Solventnaphtha (råolie), hydrogenbehandlet let naphthen-; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af cycloparaffincarbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_7, med kogeinterval omtrent fra 73 °C til 85 °C)	649-341-00-2	295-529-9	92062-15-2	P
Naphtha (råolie), let dampkrakket, hydrogeneret; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet vedseparation og efterfølgende hydrogenering af produkterne fra en dampkrakningsproces til fremstilling af ethylen. Den består overvejende af mættede og umættede paraffiner, cycliske paraffiner og cycliske aromatiske carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 50 °C til 200 °C. Forholdet mellem benzencarbonhydrider kan variere op til 30 vægtprocent, og strømmen kan også indeholde mindre mængder svovl og oxygenerede forbindelser)	649-342-00-8	296-942-7	93165-55-0	P

Carbonhydrider, C_{6-11}, hydrogenbehandlede, afaromatiserede; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som solventer, der har været underkastet hydrogenbehandling for at omdanne aromater til naphthener ved katalytisk hydrogenering)	649-343-00-3	297-852-0	93763-33-8	P
Carbonhydrider, C_{9-12}, hydrogenbehandlede, afaromatiserede; lavtkogende hydrogeneret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som solventer, der har været underkastet hydrogenbehandling for at omdanne aromater til naphthener ved katalytisk hydrogenering)	649-344-00-9	297-853-6	93763-34-9	P
Mineralsk terpentin; lavtkogende uspecificeret nafta (Et farveløst, raffineret råoliedestillat, der er fri for harske eller frastødende lugte, med kogeinterval omtrent fra 149 °C til ⌦ 205 ⌫ ~~204~~ °C)	649-345-00-4	232-489-3	8052-41-3	P
Naturgaskondensater (råolie); lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider adskilt som en væske fra naturgas i en overfladeseparator ved retrograd kondensation. Den består hovedsageligt af carbonhydrider, overvejende C_2 til C_{20}. Den er en væske ved atmosfærisk temperatur og tryk)	649-346-00-X	265-047-3	64741-47-5	P
Naturgas (råolie), rå væskeblanding; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider adskilt som en væske fra naturgas i et gasgenanvendelsesanlæg ved processer, såsom nedkøling eller absorption. Den består hovedsageligt af mættede, aliphatiske carbonhydrider, C_2 til og	649-347-00-5	265-048-9	64741-48-6	P

med C_8)				
Naphtha (råolie), let hydrokrakket; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af produkterne fra en hydrokrakningsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 180 °C)	649-348-00-0	265-071-4	64741-69-1	P
Naphtha (råolie), tung hydrokrakket; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af produkterne fra en hydrokrakningsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 65 °C til 230 °C)	649-349-00-6	265-079-8	64741-78-2	P
Naphtha (råolie), sweetenet; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste en råolienaphta en sweetening-proces for at omdanne mercaptaner eller fjerne sure urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra −10 °C til 230 °C)	649-350-00-1	265-089-2	64741-87-3	P
Naphtha (råolie), syrebehandlet; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som et raffinat fra en svovlsyrehandlingsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 90 °C til 230 °C)	649-351-00-7	265-115-2	64742-15-0	P
Naphtha (råolie), kemisk neutraliseret tung; lavtkogende uspecificeret nafta	649-352-00-2	265-122-0	64742-22-9	P

(En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en behandlingsproces for at fjerne sure materialer. Den består af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 65 °C til 230 °C)				
Naphtha (råolie), kemisk neutraliseret let; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved en behandlingsproces til fjernelse af sure materialer. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 190 °C)	649-353-00-8	265-123-6	64742-23-0	P
Naphtha (råolie), katalytisk afvokset; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved katalytisk afvoksning af en råoliefraktion. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 230 °C)	649-354-00-3	265-170-2	64742-66-1	P
Naphtha (råolie), let dampkrakket; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 190 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis 10 volumenprocent, eller mere, benzen)	649-355-00-9	265-187-5	64742-83-2	P
Solventnaphtha (råolie), let aromatisk; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra destillation af aromatiske strømme. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_8 til og	649-356-00-4	265-199-0	64742-95-6	P

med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 135 °C til 210 °C)				
Aromatiske carbonhydrider, C_{6-10}, syrebehandlede, neutraliserede; lavtkogende uspecificeret nafta	649-357-00-X	268-618-5	68131-49-7	P
Destillater (råolie), C_{3-5}, 2-methyl-2-butenrige; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillationen af carbonhydrider, sædvanligvis C_3 til og med C_5, overvejende isopentan og 3-methyl-1-buten. Den består af mættede og umættede carbonhydrider, C_3 til og med C_5, overvejende 2-methyl-2-buten)	649-358-00-5	270-725-7	68477-34-9	P
Destillater (råolie), polymeriserede dampkrakkede råoliedestillater, C_{5-12}-fraktion; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af polymeriseret dampkrakket råoliedestillat. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{12})	649-359-00-0	270-735-1	68477-50-9	P
Destillater (råolie), dampkrakkede, C_{5-12}-fraktion; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af organiske forbindelser opnået ved destillationen af produkter fra en dampkrakningsproces. Den består af umættede carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{12})	649-360-00-6	270-736-7	68477-53-2	P
Destillater (råolie), dampkrakkede, C_{5-10}-fraktion, blandet med let dampkrakket råolienaphtha-C_5-fraktion; lavtkogende uspecificeret nafta	649-361-00-1	270-738-8	68477-55-4	P
Ekstrakter (råolie), koldsyre-, C_{4-6}; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af organiske forbindelser, fremstillet ved koldsyre-	649-362-00-7	270-741-4	68477-61-2	P

enhedsekstraktion af mættede og umættede, aliphatiske carbonhydrider, sædvanligvis C_3 til og med C_6, overvejende pentaner og amylener. Den består overvejende af mættede og umættede carbonhydrider, C_4 til og med C_6, overvejende C_5)				
Destillater (råolie), depentanizer-topfraktioner; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en katalytisk krakket gasstrøm. Den består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_6)	649-363-00-2	270-771-8	68477-894-4	P
Rester (råolie), butansplitter-bundfraktioner; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat remanens fra destillationen af butanstrøm. Den består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_6)	649-364-00-8	270-791-7	68478-12-6	P
Restolier (råolie), deisobutanizertårn-; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat remanens fra den atmosfæriske destillation af butan-butylenstrømmen. Den består af aliphatiske carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_6)	649-365-00-3	270-795-9	68478-16-0	P
Naphtha (råolie), full-range coker-; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkter fra en væskecoker. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{15}, med kogeinterval omtrent fra 43 °C til 250 °C)	649-366-00-9	270-991-4	68513-02-0	P
Naphtha (råolie), dampkrakket middeltung aromatisk; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af	649-367-00-4	271-138-9	68516-20-1	P

carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 130 °C til 220 °C)				
Naphtha (råolie), lerbehandlet full-range straight-run; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af full-range straight-run naphtha med naturligt eller modificeret ler, sædvanligvis i en perkoleringsproces til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og de tilstedeværende urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 220 °C)	649-368-00-X	271-262-3	68527-21-9	P
Naphtha (råolie), lerbehandlet let straight-run; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af let straight-run naphtha med naturligt eller modificeret ler, sædvanligvis i en perkoleringsproces til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og tilstedeværende urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 93 °C til 180 °C)	649-369-00-5	271-263-9	68527-22-0	P
Naphtha (råolie), let dampkrakket aromatisk; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_9, med kogeinterval omtrent fra	649-370-00-0	271-264-4	68527-23-1	P

110 °C til 165 °C)				
Naphtha (råolie), let dampkrakket, afbenzeneret; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 80 °C til 218 °C)	649-371-00-6	271-266-5	68527-26-4	P
Nafta (råolie), aromatholdigt; lavtkogende uspecificeret nafta	649-372-00-1	271-635-0	68603-08-7	P
Benzin, pyrolyse-, debutanizerbundfraktioner; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af depropanizer-bundfraktioner. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_5)	649-373-00-7	271-726-5	68606-10-0	P
Naphtha (råolie), let sweetenet; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste et råoliedestillat en sweeteningsproces for at fjerne mercaptaner eller fjerne sure urenheder. Den består overvejende af mættede og umættede carbonhydrider, overvejende C_3 til og med C_6, med kogeinterval omtrent fra −20 °C til 100 °C)	649-374-00-2	272-206-0	68783-66-4	P
Naturgaskondensater; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider separeret og/eller kondenseret fra naturgas under transport og optagning ved borehullet og/eller fra produktionen, opsamlings-, transmissions- og distributionspipelines i undergrunden, skrubbere etc. Den	649-375-00-8	272-896-3	68919-39-1	J

består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_2 til og med C_8)				
Destillater (råolie), naphtaunifiner stripper-; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved stripning af produkterne fra naphthaunifineren. Den består af mættede, aliphatiske carbonhydrider, overvejende fra C_2 til og med C_6)	649-376-00-3	272-932-8	68921-09-5	P
Naphtha (råolie), katalytisk reformeret let, aromatfri fraktion; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider tilbageblevet efter fjernelse af aromatiske forbindelser fra katalytisk reformeret let naphtha i en selektiv absorptionsproces. Den består overvejende af paraffinske og cycliske forbindelser, overvejende C_5 til C_8, med kogeinterval omtrent fra 66 °C til 121 °C)	649-377-00-9	285-510-3	85116-59-2	P
Benzin; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider bestående primært af paraffiner, cycloparaffiner, aromatiske og olefinske carbonhydrider, overvejende større end C_3 og koger i området fra 30 °C til 260 °C)	649-378-00-4	289-220-8	86290-81-5	P
Aromatiske carbonhydrider, C_{7-8}, dealkyleringsprodukter, destillationsrester; lavtkogende uspecificeret nafta	649-379-00-X	292-698-0	90989-42-7	P
Carbonhydrider, C_{4-6}, depentanizer lette, aromatisk hydrogenbehandlede; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som det første gennemløb fra depentanizerkolonnen før hydrogenbehandling af de aromatiske charger. Den består overvejende af carbonhydrider,	649-380-00-5	295-298-4	91995-38-9	P

overvejende C_4 til og med C_6, overvejende pentaner og pentener, med kogeinterval omtrent fra 25 °C til 40 °C)				
Destillater (råolie), varmeudblødt dampkrakket naphtha, C_5-rige; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af varmeudblødt dampkrakket naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, C_4 til og med C_6, overvejende C_5)	649-381-00-0	295-302-4	91995-41-4	P
Ekstrakter (råolie), katalytisk reformeret let naphtha solvent-; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som ekstraktet fra solventekstraktionen af en katalytisk reformeret råoliefraktion. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_8, med kogeinterval omtrent fra 100 °C til 200 °C)	649-382-00-6	295-331-2	91995-68-5	P
Naphtha (råolie), hydroafsvovlet let, afaromatiseret; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af hydroafsvovlede og afaromatiserede lette råoliefraktioner. Den består overvejende af C_7-paraffiner og cycloparaffiner med kogeinterval omtrent fra 90 °C til 100 °C)	649-383-00-1	295-434-2	92045-53-9	P
Naphtha (råolie), let, C_5-rig, sweetenet; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at underkaste en råolienaphtha en sweetening-proces for at omdanne mercaptaner eller fjerne sure urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_5, overvejende C_5, med	649-384-00-7	295-442-6	92045-60-8	P

kogeinterval omtrent fra −10 °C til 35 °C)				
Carbonhydrider, C_{8-11}, naphthakrakning, toluenfraktion; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation fra præhydrogeneret, krakket naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_8 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 130 °C til 205 °C)	649-385-00-2	295-444-7	92045-62-0	P
Carbonhydrider, C_{4-11}, naphthakrakning, aromatfrie; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra præhydrogeneret, krakket naphtha efter destillativ separation af benzen- og toluenholdige carbonhydridfraktioner og en højerekogende fraktion. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 205 °C)	649-386-00-8	295-445-2	92045-63-1	P
Naphtha (råolie), let varmeudblødt, dampkrakket; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktioneringen af dampkrakket naphtha efter genindvindelse efter en varmeudblødningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_4 til og med C_6, med kogeinterval omtrent fra 0 °C til 80 °C)	649-387-00-3	296-028-8	92201-97-3	P
Destillater (råolie), C_6-rige; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af rå råolieføde. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_7, rige på C_6, og kogeinterval omtrent fra 60 °C til 70 °C)	649-388-00-9	296-903-4	93165-19-6	P

Benzin, pyrolyse-, hydrogeneret; lavtkogende uspecificeret nafta (En destillationsfraktion fra hydrogeneringen af pyrolysebenzin med kogeinterval omtrent fra 20 °C til 200 °C)	649-389-00-4	302-639-3	94114-03-1	P
Destillater (råolie), dampkrakkede, C_{8-12}-fraktion, polymeriserede, lette destillationsfraktioner; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af den polymeriserede C_8 til og med C_{12}-fraktion fra dampkrakkede råoliedestillater. De består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_8 til og med C_{12})	649-390-00-X	305-750-5	95009-23-7	P
Ekstrakter (råolie), tunge naphthasolvent-, lerbehandlede; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af tung naphthasolventråolieekstrakt med blegejord. Består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_{10}, med kogeinterval omtrent fra 80 °C til 180 °C)	649-391-00-5	308-261-5	97926-43-7	P
Naphtha (råolie), let, dampkrakket, afbenzeneret, termisk behandlet; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling og destillation af debenzeneret, let dampkrakket råolienaphtha. Den består af carbonhydrider, overvejende C_7 til og med C_{12}, med kogeinterval omtrent fra 95 °C til 200 °C)	649-392-00-0	308-713-1	98219-46-6	P
Naphtha (råolie), let, dampkrakket, termisk behandlet; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved	649-393-00-6	308-714-7	98219-47-7	P

behandlingen og destillationen af let, dampkrakket råolienaphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_6, med kogeinterval omtrent fra 35 °C til 80 °C)				
Destillater (råolie), C_{7-9}, C_8-rige, hydroafsvovlede afaromatiserede; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af en let råoliefraktion, hydroafsvovlet og afaromatiseret. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_7, til og med C_9 overvejende C_8 paraffiner og cycloparaffiner, med kogeinterval omtrent fra 120 °C til 130 °C)	649-394-00-1	309-862-5	101316-56-7	P
Carbonhydrider, C_{6-8}, hydrogenerede sorptionsafaromatiserede, toluenraffinering; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået under sorptionen af toluen fra en carbonhydridfraktion fra krakket benzin behandlet med hydrogen, i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_6 til og med C_8, med kogeinterval omtrent fra 80 °C til 135 °C)	649-395-00-7	309-870-9	101316-66-9	P
Naphtha (råolie), hydroafsvovlet full-range coker-; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering fra hydroafsvovlet cokerdestillat. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_{11}, med kogeinterval omtrent fra 23 °C til 196 °C)	649-396-00-2	309-879-8	101316-76-1	P
Naphtha (råolie), sweetenet let; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af	649-397-00-8	309-976-5	101795-01-1	P

carbonhydrider opnået ved at underkaste en råolienaphtha en sweeteningproces, for at omdanne mercaptaner eller for at fjerne sure urenheder. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_5 til og med C_8, med kogeinterval omtrent fra 20 °C til 130 °C)				
Carbonhydrider, C_{3-6}, C_5-rige, dampkrakket naphtha; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af dampkrakket naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider, C_3 til og med C_6, overvejende C_5)	649-398-00-3	310-012-0	102110-14-5	P
Carbonhydrider, C_5-rige, bicyclopentadienholdige; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillation af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, C_5 og bicyclopentadien, med kogeinterval omtrent fra 30 °C til 170 °C)	649-399-00-9	310-013-6	102110-15-6	P
Rester (råolie), dampkrakkede lette, aromatiske; lavtkogende uspecificeret nafta (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved destillationen af produkterne fra dampkrakning eller lignende processer, efter fjernelse af de meget lette produkter, resulterende i en rest begyndende med carbonhydrider med carbonantal større end C_5. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, større end C_5, og koger omtrent over 40 °C)	649-400-00-2	310-057-6	102110-55-4	P
Carbonhydrider, C ⌦ ≥ ⌫ 5, C_{5-6}-rige; lavtkogende uspecificeret nafta	649-401-00-8	270-690-8	68476-50-6	P
Carbonhydrider, C_5-rige; lavtkogende	649-402-00-3	270-695-5	68476-55-1	P

uspecificeret nafta				
Aromatiske carbonhydrider, C_{8-10}; redestilleret letolie, højtkogende	649-403-00-9	292-695-4	90989-39-2	P
Destillater (råolie), lette katalytisk krakkede; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 400 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del bicycliske, aromatiske carbonhydrider)	649-435-00-3	265-060-4	64741-59-9	
Destillater (råolie), intermediære katalytisk krakkede; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkter fra en katalytisk krakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{11} til og med C_{30}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 450 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del tricycliske, aromatiske carbonhydrider)	649-436-00-9	265-062-5	64741-60-2	
Destillater (råolie), lette termisk krakkede; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af produkterne fra en termisk krakningsproces. Den består overvejende af umættede carbonhydrider, overvejende C_{10} til og med C_{22}, med kogeinterval omtrent fra 160 °C til 370 °C)	649-438-00-X	265-084-5	64741-82-8	
Destillater (råolie), hydroafsvovlede lette katalytisk krakkede; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle lette, katalytisk krakkede destillater med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, som fjernes.	649-439-00-5	269-781-5	68333-25-5	

Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_9 til og med C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 400 °C. Den indeholder en forholdsvis stor del bicycliske, aromatiske carbonhydrider)				
Destillater (råolie), let dampkrakket naphtha; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra den multiple destillation af produkter fra en dampkrakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{10} til og med C_{18})	649-440-00-0	270-662-5	68475-80-9	
Destillater (råolie), krakkede dampkrakkede råoliedestillater; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at destillere et krakket dampkrakket destillat og/eller dets fraktioneringsprodukter. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{10} til lavmolekylære polymerer)	649-441-00-6	270-727-8	68477-38-3	
Gasolier (råolie), dampkrakkede; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillationen af produkterne fra en dampkrakningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_9, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 400 °C)	649-442-00-1	271-260-2	68527-18-4	
Destillater (råolie), hydroafsvovlede termisk krakkede middeltunge; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering fra hydroafsvovlet, termiske krakkede destillatråstoffer. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{11} til C_{25}, med kogeinterval omtrent fra 205 °C til 400 °C)	649-443-00-7	285-505-6	85116-53-6	

Gasolier (råolie), termisk krakkede, hydrogenafsvovlede; krakket gasolie	649-444-00-2	295-411-7	92045-29-9	
Rester (råolie), hydrogeneret dampkrakket naphtha; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som en restfraktion fra destillationen af hydrogenbehandlet dampkrakket naphtha. Den består overvejende af carbonhydrider med kogeinterval omtrent fra 200 °C til 350 °C)	649-445-00-8	295-514-7	92062-00-5	
Rester (råolie), dampkrakkede naphthadestillations-; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som en kolonnebundfraktion fra separationen af udløb fra dampkrakning af naphtha ved høj temperatur. Den har kogeinterval omtrent fra 147 °C til 300 °C, og danner en færdig olie med en viskositet på ~~18 eSt ved 50 °C~~ ⌦ 18 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 50 °C ⌫)	649-446-00-3	295-517-3	92062-04-9	
Destillater (råolie), lette katalytisk krakkede, termisk nedbrudte; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved destillation af produkterne fra en katalytisk krakningsproces, der har været brugt som en varmeoverførselsvæske. Den består overvejende af carbonhydrider med kogeinterval omtrent fra 190 °C til 340 °C. Denne strøm indeholder sandsynligvis organiske svovlforbindelser)	649-447-00-9	295-991-1	92201-60-0	
Rester (råolie), dampkrakket varmeudblødt naphtha; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider, opnået som rest fra destillationen af dampkrakket varmeudblødt naphtha, med kogeinterval omtrent fra 150 °C til 350	649-448-00-4	297-905-8	93763-85-0	

°C)				
Gasolier (råolie), lette vakuum-, termiskkrakkede hydroafsvovlede; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved katalytisk hydroafsvovling af termiskkrakket let vakuumråolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{14} til og med C_{20}, med kogeinterval omtrent fra 270 °C til 370 °C)	649-450-00-5	308-278-8	97926-59-5	
Destillater (råolie), hydroafsvovlede middeltunge coker-; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fraktionering fra hydroafsvovlede cokerdestillat råstoffer. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{12} til og med C_{21}, med kogeinterval omtrent fra 200 °C til 360 °C)	649-451-00-0	309-865-1	101316-59-0	
Destillater (råolie), tunge dampkrakkede; krakket gasolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved dampkrakkede tunge rester. Den består overvejende af polyalkylerede tunge aromatiske carbonhydrider, med kogeinterval omtrent fra 250 °C til 400 °C)	649-452-00-6	309-939-3	101631-14-5	
Destillater (råolie), tunge hydrokrakkede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fra destillation af produkterne fra en hydrokrakningsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, C_{15}-C_{39}, med kogeinterval omtrent fra 260 °C til 600 °C)	649-453-00-1	265-077-7	64741-76-0	L
Destillater (råolie), solventraffinerede tunge paraffin-; uspecificeret baseolie	649-454-00-7	265-090-8	64741-88-4	L

(En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠)				
Destillater (råolie), solventraffinerede lette paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠)	649-455-00-2	265-091-3	64741-89-5	L
Restolier (råolie), solventafasfalterede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som den solventopløselige fraktion fra C_3-C_4-solventafasfaltering af en remanens. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{25}, og koger omtrent over 400 °C)	649-456-00-8	265-096-0	64741-95-3	L
Destillater (råolie), solventraffinerede tunge naphthen-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠ . Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-457-00-3	265-097-6	64741-96-4	L
Destillater (råolie), solventraffinerede lette naphthen-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af	649-458-00-9	265-098-1	64741-97-5	L

carbonhydrider opnået som raffinatet fra en solventekstraktionsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫ . Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)				
Restolier (råolie), solventraffinerede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som den solventuopløselige fraktion fra solventraffinering af en remanens, ved at anvende et polært organisk solvent, såsom phenol eller furfural. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{25}, og koger omtrent over 400 °C)	649-459-00-4	265-101-6	64742-01-4	L
Destillater (råolie), lerbehandlede tunge paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af en råoliefraktion med naturligt eller modificeret ler, i enten en kontakt- eller perkoleringsproces, til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og tilstedeværende urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder en forholdsvis stor del mættede carbonhydrider)	649-460-00-X	265-137-2	64742-36-5	L
Destillater (råolie), lerbehandlede lette paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af en råoliefraktion med naturligt eller modificeret ler, i enten en kontakt- eller perkoleringsproces, til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og tilstedeværende urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med	649-461-00-5	265-138-8	64742-37-6	L

en viskositet på mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder en forholdsvis stor del mættede carbonhydrider)				
Restolier (råolie), lerbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af en restolie med naturligt eller modificeret ler, i enten en kontakt- eller perkoleringsproces, til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og tilstedeværende urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{25}, og koger omtrent over 400 °C)	649-462-00-0	265-143-5	64742-41-2	L
Destillater (råolie), lerbehandlede tunge naphthen-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af en råoliefraktion med naturligt eller modificeret ler, i enten en kontakt- eller perkoleringsproces, til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og tilstedeværende urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-463-00-6	265-146-1	64742-44-5	L
Destillater (råolie), lerbehandlede lette naphthen-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af en råoliefraktion med naturligt eller modificeret ler, i enten en kontakt- eller perkoleringsproces, til fjernelse af spormængderne af polære forbindelser og tilstedeværende urenheder. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫.	649-464-00-1	265-147-7	64742-45-6	L

Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)				
Destillater (råolie), hydrogenbehandlede tunge naphthen-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-465-00-7	265-155-0	64742-52-5	L
Destillater (råolie), hydrogenbehandlede lette naphthen-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-466-00-2	265-156-6	64742-53-6	L
Destillater (råolie), hydrogenbehandlede tunge paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder en forholdsvis stor del mættede carbonhydrider)	649-467-00-8	265-157-1	64742-54-7	L
Destillater (råolie), hydrogenbehandlede lette paraffin-; uspecificeret baseolie	649-468-00-3	265-158-7	64742-55-8	L

(En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder en forholdsvis stor del mættede carbonhydrider)				
Destillater (råolie), solventafvoksede lette paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fjernelse af normalparaffiner fra en råoliefraktion ved solventkrystallisation. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-469-00-9	265-159-2	64742-56-9	L
Restolier (råolie), hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{25}, og koger omtrent over 400 °C)	649-470-00-4	265-160-8	64742-57-0	L
Restolier (råolie), solventafvoksede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fjernelse af lange, forgrenede carbonhydrider fra en restolie ved solventkrystallisation. Den består af carbonhydrider, overvejende større end C_{25}, og koger omtrent over 400 °C)	649-471-00-X	265-166-0	64742-62-7	L
Destillater (råolie), solventafvoksede tunge naphthen; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fjernelse af normalparaffiner fra en råoliefraktion ved solventkrystallisation. Den består af	649-472-00-5	265-167-6	64742-63-8	L

carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet ikke mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)				
Destillater (råolie), solventafvoksede lette naphthen-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fjernelse af normalparaffiner fra en råoliefraktion ved solventkrystallisation. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-473-00-0	265-168-1	64742-64-9	L
Destillater (råolie), solventafvoksede tunge paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved fjernelse af normalparaffiner fra en råoliefraktion ved solventkrystallisation. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet ikke mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-474-00-6	265-169-7	64742-65-0	L
Naphthenolier (råolie), katalytisk afvoksede tunge; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk afvoksningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-475-00-1	265-172-3	64742-68-3	L
Naphthenolier (råolie), katalytisk afvoksede lette; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk	649-476-00-7	265-173-9	64742-69-4	L

afvoksningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)				
Paraffinolier (råolie), katalytisk afvoksede tunge; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk afvoksningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠)	649-477-00-2	265-174-4	64742-70-7	L
Paraffinolier (råolie), katalytisk afvoksede lette; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved en katalytisk afvoksningsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠)	649-478-00-8	265-176-5	64742-71-8	L
Naphthenolier (råolie), sammensatte afvoksede tunge; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at fjerne ligekædede paraffincarbonhydrider som et fast stof ved behandling med et reagens, såsom urinstof. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-479-00-3	265-179-1	64742-75-2	L
Naphthenolier (råolie), komplekse afvoksede lette; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en katalytisk	649-480-00-9	265-180-7	64742-76-3	L

afvoksningsproces. Den består af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder relativt få normalparaffiner)				
Smøreolier (råolie), C_{20-50}, hydrogenbehandlede olie baseret, høj viskositet; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle let vakuumgasolie, tung vakuumgasolie og solvent afasfalteret restolie med hydrogen, i tilstedeværelse af en katalysator, i en totrinsproces med afvoksning udført mellem de to trin. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på omtrent ~~112 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 112 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder en relativ stor mængde af mættede carbonhydrider)	649-481-00-4	276-736-3	72623-85-9	L
Smøreolier (råolie), C_{15-30}, hydrogenbehandlede neutral olie baserede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle let vakuumgasolie, tung vakuumgasolie og solvent afasfalteret restolie med hydrogen, i tilstedeværelse af en katalysator, i en totrinsproces med afvoksning udført mellem de to trin. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på omtrent ~~15 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 15 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠. Den indeholder en relativ stor mængde mættede carbonhydrider)	649-482-00-X	276-737-9	72623-86-0	L
Smøreolier (råolie), C_{20-50}, hydrogenbehandlede neutral olie baserede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle	649-483-00-5	276-738-4	72623-87-1	L

let vakuumgasolie, tung vakuumgasolie og solvent afasfalteret restolie med hydrogen, i tilstedeværelse af en katalysator, i en totrinsproces med afvoksning udført mellem de to trin. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på omtrent ~~32 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 32 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder en relativ stor mængde mættede carbonhydrider)				
Smøreolier; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventekstraktion og afvoksningsprocesser. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, C_{15} til og med $_{50}$)	649-484-00-0	278-012-2	74869-22-0	L
Destillater (råolie), sammensatte afvoksede tunge paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved afvoksning af et tungt paraffindestillat. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet på ~~19 eSt eller mere ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ eller mere ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsmæssigt få normalparaffiner)	649-485-00-6	292-613-7	90640-91-8	L
Destillater (råolie), sammensatte afvoksede lette paraffin-; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved afvoksning af et let paraffindestillat. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{12} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mindre end ~~19 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den indeholder forholdsvis få normalparaffiner)	649-486-00-1	292-614-2	90640-92-9	L

Destillater (råolie), solventafvoksede tunge paraffin-, lerbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en afvoksning af et tungt paraffindestillat med neutral eller modificeret ler i enten en kontakt- eller perkoleringsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50})	649-487-00-7	292-616-3	90640-94-1	L
Carbonhydrider, C_{20-50}, solventafvoksede tunge paraffin-, hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved at behandle et afvokset tungt paraffindestillat med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50})	649-488-00-2	292-617-9	90640-95-2	L
Destillater (råolie), solventafvoksede lette paraffin-, lerbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremkommet ved behandling af et afvokset let paraffindestillat med naturligt eller modificeret ler i enten en kontakt- eller perkoleringsproces. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30})	649-489-00-8	292-618-4	90640-96-3	L
Destillater (råolie), solventafvoksede lette paraffin-, hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved at behandle et afvokset let paraffindestillat med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30})	649-490-00-3	292-620-5	90640-97-4	L

Restolier (olie), hydrogenbehandlede, solventafvoksede; uspecificeret baseolie	649-491-00-9	292-656-1	90669-74-2	L
Restolier (råolie), katalytisk afvoksede; uspecificeret baseolie	649-492-00-4	294-843-3	91770-57-9	L
Destillater (råolie), afvoksede tunge paraffin-, hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en intensiv hydrogenbehandling af afvokset destillat i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_{25} til og med C_{39}, og danner en færdig olie med en viskositet på omtrent ~~44 cSt ved 50 °C~~ ⌦ 44 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 50 °C ⌫)	649-493-00-X	295-300-3	91995-39-0	L
Destillater (råolie), afvoksede lette paraffin-, hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra en intensiv hydrogenbehandling af afvoksede destillater i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af mættede carbonhydrider, overvejende C_{21} til og med C_{29}, og danner en færdig olie med en viskositet på omtrent ~~13 cSt ved 50 °C~~ ⌦ 13 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 50 °C ⌫)	649-494-00-5	295-301-9	91995-40-3	L
Destillater (råolie), hydrokrakkede solventraffinerede, afvoksede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af flydende carbonhydrider opnået ved rekrystallisation af afvoksede, hydrokrakkede, solventraffinerede råoliedestillater)	649-495-00-0	295-306-6	91995-45-8	L
Destillater (råolie), solventraffinerede naphthen-, hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af	649-496-00-6	295-316-0	91995-54-9	L

carbonhydrider opnået ved at behandle en råoliefraktion med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator og fjerne de aromatiske carbonhydrider ved solventekstraktion. Den består overvejende af naphthencarbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}, og danner en færdig olie med en viskositet på mellem ~~13 cSt og 15 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 13 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ til 15 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)				
Smøreolier (råolie) C_{17-35}, solventekstraherede, afvoksede, hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie	649-497-00-1	295-423-2	92045-42-6	L
Smøreolier (råolie), hydrokrakkede ikke-aromatiske solventafparaffinerede; uspecificeret baseolie	649-498-00-7	295-424-8	92045-43-7	L
Restolier (råolie), hydrokrakkede syrebehandlede solventafvoksede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider, fremstillet ved solventfjernelse af paraffiner fra resten fra destillationen af syrebehandlede, hydrokrakkede tunge paraffiner, og koger omtrent over 380 °C)	649-499-00-2	295-499-7	92061-86-4	L
Paraffinolier (råolier), solventraffinerede afvoksede tunge; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra svovlholdig paraffinråolie. Den består overvejende af en solventraffineret, afparaffineret smøreolie med en viskositet på ~~65 cSt ved 50 °C~~ ⌦ 65 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 50 °C ⌫)	649-500-00-6	295-810-6	92129-09-4	L
Smøreolier (råolie), basisolier, paraffinske; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved raffinering af råolie. Den består overvejende af aromater, naphthener og paraffiner, og danner en færdig olie med en viskositet	649-501-00-1	297-474-6	93572-43-1	L

på ~~23 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 23 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)				
Carbonhydrider, hydrokrakkede paraffiniske destillationsrester, solventafvoksede; uspecificeret baseolie	649-502-00-7	297-857-8	93763-38-3	L
Carbonhydrider, C_{20-50}, restolie-hydrogenerings-vakuumdestillat-; uspecificeret baseolie	649-503-00-2	300-257-1	93924-61-9	L
Destillater (råolie), solventraffinerede hydrogenbehandlede tunge, hydrogenerede; uspecificeret baseolie	649-504-00-8	305-588-5	94733-08-1	L
Destillater (råolie), solventraffinerede hydrokrakkede lette; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solvent afaromatisering af resten fra hydrokrakket råolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{18} til og med C_{27}, med kogeinterval omtrent fra 370 °C til 450 °C)	649-505-00-3	305-589-0	94733-09-2	L
Smøreolier (råolie), C_{18-40}, solventafvoksede hydrokrakkede destillatbaserede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventafparaffinering af destillationsresten fra hydrokrakket råolie. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{18} til og med C_{40}, med kogeinterval omtrent fra 370 °C til 550 °C)	649-506-00-9	305-594-8	94733-15-0	L
Smøreolier (råolie), C_{18-40}, solventafvoksede hydrogenerede raffinatbaserede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventafparaffinering af det hydrogenerede raffinat, opnået ved solventekstraktion af et hydrogenbehandlet råoliedestillat. Den	649-507-00-4	305-595-3	94733-16-1	L

består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{18} til og med C_{40}, med kogeinterval omtrent fra 370 °C til 550 °C)				
Carbonhydrider, C_{13-30}, aromatrige, solventekstraherede naphthenske destillater; uspecificeret baseolie	649-508-00-X	305-971-7	95371-04-3	L
Carbonhydrider, C_{16-32}, aromatrige, solventekstraherede naphthenske destillater; uspecificeret baseolie	649-509-00-5	305-972-2	95371-05-4	L
Carbonhydrider, C_{37-68}, afvoksede afasfalterede hydrogenbehandlede vakuumdestillationsrester; uspecificeret baseolie	649-510-00-0	305-974-3	95371-07-6	L
Carbonhydrider, C_{37-65}, hydrogenbehandlede afasfalterede vakuumdestillationsrester; uspecificeret baseolie	649-511-00-6	305-975-9	95371-08-7	L
Destillater (råolie), hydrokrakkede solventraffinerede lette; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventbehandlingen af et destillat fra hydrokrakkede råoliedestillater. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{18} til og med C_{27}, med kogeinterval omtrent fra 370 °C til 450 °C)	649-512-00-1	307-010-7	97488-73-8	L
Destillater (råolie), solventraffinerede hydrogenerede tunge; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandlingen af et hydrogeneret råoliedestillat med et solvent. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{19} til og med C_{40}, med kogeinterval omtrent fra 390 °C til 550 °C)	649-513-00-7	307-011-2	97488-74-9	L
Smøreolier (råolie), C_{18-27}, hydrokrakkede solventafvoksede; uspecificeret baseolie	649-514-00-2	307-034-8	97488-95-4	L

Carbonhydrider, C_{17-30}, hydrogenbehandlet solventafasfalteret atmosfærisk destillationsrest, lette destillater; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som forløb fra vakuumdestillationen af udløb fra behandlingen af en solventafasfalteret kort rest med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{17} til og med C_{30}, med kogeinterval omtrent fra 300 °C til 400 °C. Den danner en færdig olie med en viskositet på ~~4 eSt ved omtrent 100 °C~~ ⌦ $4\ 10^{-6}$ $m^2.s^{-1}$ ved omtrent 100 °C ⌫)	649-515-00-8	307-661-7	97675-87-1	L
Carbonhydrider, C_{17-40}, hydrogenbehandlet solventafasfalteret destillationsrest, lette vakuumdestillater; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som forløb fra vakuumdestillationen af udløb fra den katalytiske hydrogenbehandling af en solventafasfalteret kort rest, med en viskositet på ~~8 eSt ved omtrent 100 °C~~ ⌦ $8\ 10^{-6}$ $m^2.s^{-1}$ ved omtrent 100 °C ⌫. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{17} til og med C_{40}, med kogeinterval omtrent fra 300 °C til 500 °C)	649-516-00-3	307-755-8	97722-06-0	L
Carbonhydrider, C_{13-27}, solventekstraherede lette naphthenske; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved ekstraktion af aromaterne fra et let naphthendestillat med en viskositet på ~~9,5 eSt ved 40 °C~~ ⌦ $9,5\ 10^{-6}$ $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{27}, med kogeinterval omtrent fra 240 °C til 400 °C)	649-517-00-9	307-758-4	97722-09-3	L

Carbonhydrider, C_{14-29}, solventekstraherede lette naphthenske; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved ekstraktion af aromaterne fra et let naphthendestillat, med en viskositet på ~~16 cSt ved 40 °C~~ ⌦ 16 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{14} til og med C_{29}, med kogeinterval omtrent fra 250 °C til 425 °C)	649-518-00-4	307-760-5	97722-10-6	L
Carbonhydrider, C_{27-42}, dearomatiserede; uspecificeret baseolie	649-519-00-X	308-131-8	97862-81-2	L
Carbonhydrider, C_{17-30}, hydrogenbehandlede destillater, lette destillationsfraktioner; uspecificeret baseolie	649-520-00-5	308-132-3	97862-82-3	L
Carbonhydrider, C_{27-45}, naphthenske vakuumdestillations-; uspecificeret baseolie	649-521-00-0	308-133-9	97862-83-4	L
Carbonhydrider, C_{27-45}, dearomatiserede; uspecificeret baseolie	649-522-00-6	308-287-7	97926-68-6	L
Carbonhydrider, C_{20-58}, hydrogenbehandlede; uspecificeret baseolie	649-523-00-1	308-289-8	97926-70-0	L
Carbonhydrider, C_{27-42}, naphthenske; uspecificeret baseolie	649-524-00-7	308-290-3	97926-71-1	L
Restolier (råolie), carbonbehandlede solventafvoksede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling af solventafvoksede råolierestolier med aktivt kul, for at fjerne spor af polære bestanddele og urenheder)	649-525-00-2	309-710-8	100684-37-5	L
Restolier (råolie), lerbehandlede solventafvoksede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling	649-526-00-8	309-711-3	100684-38-6	L

af solventafvoksede råolierestolier med blegejord, for at fjerne spor af polære bestanddele og urenheder)				
Smøreolier (råolie), C_{25}, solventekstraherede, afasfalterede, afvoksede, hydrogenerede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventekstraktion og hydrogenering af vakuumdestillationsrester. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende større end C_{25}, og danner en færdig olie med en viskositet i området ~~32 eSt til 37 eSt ved 100 °C~~ ⌦ 32 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ til 37 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 100 °C ⌫)	649-527-00-3	309-874-0	101316-69-2	L
Smøreolier (råolie), C_{17-32}, solventekstraherede, afvoksede, hydrogenerede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventekstraktion og hydrogenering af atmosfærisk destillationsrester. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{17} til og med C_{32}, og danner en færdig olie med en viskositet i området fra ~~17 eSt til 23 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 17 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ til 23 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-528-00-9	309-875-6	101316-70-5	L
Smøreolier (råolie), C_{20-35}, solventekstraherede, afvoksede, hydrogenerede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventekstraktion og hydrogenering af atmosfærisk destillationsrester. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{35}, og danner en færdig olie med en viskositet i området fra ~~37 eSt til 44 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 37 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ til 44 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-529-00-4	309-876-1	101316-71-6	L
Smøreolier (råolie), C_{24-50}, solventekstraherede, afvoksede,	649-530-00-	309-877-7	101316-72-7	L

hydrogenerede; uspecificeret baseolie (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventekstraktion og hydrogenering af atmosfærisk destillationsrester. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{24} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet i området fra ~~16 eSt til 75 eSt ved 40 °C~~ ⌦ 16 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ til 75 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	X			
Ekstrakter (råolie), tungt naphthendestillat solvent-, aromatkoncentrat; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (Et aromatkoncentrat fremstillet ved at sætte vand til solventekstrakter og ekstraktionssolvent af tungt naphthadestillat)	649-531-00-5	272-175-3	68783-00-6	L
Ekstrakter (råolie), solventraffineret tungt paraffindestillat solvent-; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som ekstraktet fra re-ekstraktionen af solventraffineret, tungt paraffindestillat. Den består af mættede og aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50})	649-532-00-0	272-180-0	68783-04-0	L
Ekstrakter (råolie), tunge paraffindestillater, solvent-afasfalterede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som ekstraktet fra en solventekstraktion af tungt paraffindestillat)	649-533-00-6	272-342-0	68814-89-1	L
Ekstrakter (råolie), tungt naphthendestillat solvent-, hydrogenbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved behandling	649-534-00-1	292-631-5	90641-07-9	L

af et tungt naphthendestillatsolventekstrakt med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}, og danner en færdig olie på mindst ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠)				
Ekstrakter (råolie), tungt paraffindestillat solvent-, hydrogenbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved at behandle et tungt paraffindestillat-solventekstrakt med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{21} til og med C_{33}, med kogeinterval omtrent fra 350 °C til 480 °C)	649-535-00-7	292-632-0	90641-08-0	L
Ekstrakter (råolie), let paraffindestillat solvent-, hydrogenbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider fremstillet ved at behandle et let paraffindestillat-solventekstrakt med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{17} til og med C_{26}, med kogeinterval omtrent fra 280 °C til 400 °C)	649-536-00-2	292-633-6	90641-09-1	L
Ekstrakter (råolie), hydrogenbehandlet let paraffindestillat solvent-; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som ekstraktet fra solventekstraktion af et intermediært paraffintopsolventdestillat, der er behandlet med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{16} til og	649-537-00-8	295-335-4	91995-73-2	L

med C_{36})				
Ekstrakter (råolie), let naphthendestillat solvent-, hydroafsvovlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved at behandle ekstraktet, opnået fra en solventekstraktionsproces, med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator under betingelser primært til fjernelse af svovlforbindelser. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{30}. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider, bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-538-00-3	295-338-0	91995-75-4	L
Ekstrakter (råolie), let paraffindestillat solvent-, syrebehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som en fraktion fra destillationen af et ekstrakt fra solventekstraktionen af lette paraffintopfraktion-råoliedestillater, der er underkastet en svovlsyreraffinering. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{16} til og med C_{32})	649-539-00-9	295-339-6	91995-76-5	L
Ekstrakter (råolie), let paraffindestillat solvent-, hydroafsvovlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventekstraktion af et let paraffindestillat og behandlet med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, det fjernes. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{40}, og danner en færdig olie med viskositet på mere end ~~10 eSt ved 40 °C~~ ⊠ 10^{-5} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⊠)	649-540-00-4	295-340-1	91995-77-6	L

Ekstrakter (råolie), let vakuumgasolie solvent-, hydrogenbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider, opnået ved solventekstraktion af let vakuumråoliegasolier og behandlet med hydrogen i tilstedeværelse af en katalysator. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{30})	649-541-00-X	295-342-2	91995-79-8	L
Ekstrakter (råolie), tungt paraffindestillat solvent-, lerbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra behandling af en råoliefraktion med naturligt eller modificeret ler i enten en kontakt- eller perkolationsproces for at fjerne spormængderne af polære forbindelser eller tilstedeværende urenheder. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50}. Denne strøm indeholder sandsynligvis 5 vægtprocent, eller mere, aromatiske carbonhydrider bestående af 4- til 6-leddede kondenserede ringe)	649-542-00-5	296-437-1	92704-08-0	L
Ekstrakter (råolie), tungt naphthendestillat solvent-, hydroafsvovlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra et råolieråstof ved behandling med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, der fjernes. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet større end ~~19 cSt ved 40 °C~~.⌦ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)	649-543-00-0	297-827-4	93763-10-1	L
Ekstrakter (råolie), solventafvoksede	649-544-00-6	297-829-5	93763-11-2	L

tunge paraffindestillatsolvent-, hydroafsvovlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået fra et solventafvokset råolieråstof ved behandling med hydrogen for at omdanne organisk svovl til hydrogensulfid, der fjernes. Den består overvejende af carbonhydrider, overvejende C_{15} til og med C_{50}, og danner en færdig olie med en viskositet større end ~~19 cSt ved 40 °C~~ ⊠ 19 10^{-6} $m^2.s^{-1}$ ved 40 °C ⌫)				
Ekstrakter (råolie), let paraffindestillat solvent-, carbonbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som en fraktion fra destillation af et ekstrakt genvundet ved solventekstraktion af let paraffin topråoliedestillat, behandlet med aktivt kul, for at fjerne spor af polære bestanddele og urenheder. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{16} til og med C_{32})	649-545-00-1	309-672-2	100684-02-4	L
Ekstrakter (råolie), let paraffindestillat solvent-, lerbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået en fraktion fra destillation af et ekstrakt genvundet ved solventekstraktion af let paraffin-topråoliedestillat, behandlet med blegejord, for at fjerne spor af polære bestanddele og urenheder. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{32})	649-546-00-7	309-673-8	100684-03-5	L
Ekstrakter (råolie), let vakuum, gasoliesolvent, carbonbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af	649-547-00-2	309-674-3	100684-04-6	L

carbonhydrider opnået ved solventekstraktion af let vakuumråoliegasolie behandlet med aktivt kul, for at fjerne spor af polære bestanddele og renheder. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{30})				
Ekstrakter (råolie), let vakuumgasolie solvent-, lerbehandlede; aromatisk ekstrakt af destillat (behandlet) (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået ved solventekstraktion af lette vakuumgasolier behandlede med blegejord, for at fjerne spor af polære bestanddele og urenheder. Den består overvejende af aromatiske carbonhydrider, overvejende C_{13} til og med C_{30})	649-548-00-8	309-675-9	100684-05-7	L
Foots oil (råolie); solventekstraherede eller afvoksede tunge restolier (En sammensat blanding af carbonhydrider opnået som oliefraktionen fra en solventafolierings- eller vokssvedningsproces. Den består overvejende af forgrenede carbonhydrider, overvejende C_{20} til og med C_{50})	649-549-00-3	265-171-8	64742-67-2	L
Foots oil (råolie), hydrogenbehandlet; solventekstraherede eller afvoksede tunge restolier	649-550-00-9	295-394-6	92045-12-0	L

↓ 2001/41/EF, artikel 1, nr. 2

Ildfaste keramiske fibre; specialfibre, med undtagelse af de fibre, der er nævnt andetsteds i bilag I til direktiv 67/548/EØF; (Syntetiske glasagtige (silikat)fibre uden bestemt orientering og med et indhold af alkaliske oxider og alkaliske jordarters oxider ($Na_2O + K_2O + CaO + MgO + Ba$	650-017-00-8			R

O) på 18 vægtprocent og derunder)				

↓ 97/56/EF (tilpasset)

Tillæg 3

Punkt 29 — Mutagene: kategori 1

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

⌦ Tillæg 4 ⌫

Punkt ~~30~~ ⌦ 29 ⌫ — Mutagene: kategori 2

Stoffer	Indeksnummer	EF-nummer	CAS-nummer	Noter
Hexamethylphosphortriamid	015-106-00-2	211-653-8	680-31-9	
Diethylsulfat	016-027-00-6	200-589-6	64-67-5	

↓ 1999/43/EF, artikel 1 (tilpasset)

Kaliumdichromat	024-002-00-6	231-906-6	7778-50-9	
Ammoniumdichromat	024-003-00-1	232-143-1	7789-09-5	
Natriumdichromat	024-004-00-7	234-190-3	10588-01-9	
Natriumdichromat, dihydrat	024-004-01-4	234-190-3	7789-12-0	
Chromyldichlorid	024-005-00-2	239-056-8	14977-61-8	
Kaliumchromat	024-006-00-8	232-140-5	7789-00-6	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Natriumchromat	024-018-00-3	231-889-5	7775-11-3	E

↓ 2003/34/EF, artikel 1

Cadmiumfluorid	048-006-00-2	232-222-0	7790-79-6	
Cadmiumchlorid	048-008-00-3	233-296-7	10108-64-2	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Butan [indhold ≥ 0,1 % butadien (203-450-8)] [1] Isobutan [indhold ≥ 0,1 % butadien (203-450-8)] [2]	601-004-01-8	203-448-7 [1] 20-857-2 [2]	106-97-8 [1] 75-28-5 [2]	C, S
1,3-Butadiene Buta-1,3-dien	601-013-00-X	203-450-8	106-99-0	D

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

Benzo[a]pyren; benzo[d,e,f]chrysen	601-032-00-3	200-028-5	50-32-8	
1,2-dibrom-3-chlorpropan	602-021-00-6	202-479-3	96-12-8	
Ethylenoxid; oxiran	603-023-00-X	200-849-9	75-21-8	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Propylenoxid; 1,2-Epoxypropan; Methyloxiran	603-055-00-4	200-879-2	75-56-9	E

↓ 2003/34/EF, artikel 1

2,2'-Bioxiran; 1,2:3,4-diepoxybutan	603-060-00-1	215-979-1	1464-53-5	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

Methylacrylamidomethoxyacetat (der indeholder ≥ 0,1 %	607-190-00-X	401-890-7	77402-03-0	

acrylamid)				
Methylacrylamidoglycolat (der indeholder ≥ 0,1 % acrylamid)	607-210-00-7	403-230-3	77402-05-2	
Ethylenimin; aziridin	613-001-00-1	205-793-9	151-56-4	

↓ 1999/43/EF, artikel 1

1,3,5,-tris (oxiranylmethyl)-1,3,5-triazin-2,4,6 (1H,3H,5H)-trion; TGIC	615-021-00-6	219-514-3	2451-62-9	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

Acrylamid	616-003-00-0	201-173-7	79-06-1	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

1,3,5-Tris-[(2S og 2R)-2,3-epoxypropyl]-1,3,5-triazin-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion	616-091-00-0	423-400-0	59653-74-6	E

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

⌦ Tillæg 5 ⌫

Punkt ~~31~~ ⌦ 30 ⌫ — Reproduktionstoksiske stoffer: kategori 1

Stoffer	Indeksnummer	EF-nummer	CAS-nummer	Noter
Carbonmonoxid; kulmonoxid; kulilte	006-001-00-2	211-128-3	630-08-0	
Blyhexafluorosilicat	009-014-00-1	247-278-1	25808-74-6	
Blyforbindelser, undtagen sådanne nævnt andetsteds i dette bilag	082-001-00-6			
Blyalkyler	082-002-00-1			
Blyazid	082-003-00-7	236-542-1	13424-46-9	
Blychromat	082-004-00-2	231-846-0	7758-97-6	
Blydi(acetat)	082-005-00-8	206-104-4	301-04-2	
Triblybis(orthophosphat)	082-006-00-3	231-205-5	7446-27-7	
Blyacetat, basiskt	082-007-00-9	215-630-3	1335-32-6	
Bly(II)methansulfonat	082-008-00-4	401-750-5	17570-76-2	
Blysulfochromatgul; (Denne forbindelse identificeres i Colour Index ved Colour Index Constitution Number, C.I. 77603)	082-009-00-X	215-693-7	1344-37-2	
Blychromatmolybdatsulfatrød (Denne forbindelse identificeres i Colour Index ved Colour Index Constitution Number, C.I. 77605)	082-010-00-5	235-759-9	12656-85-8	
Blyhydrogenarsenat	082-011-00-0	232-064-2	7784-40-9	

		↓ 1999/43/EF, artikel 1		
1,2-dibrom-3-cloropropan	602-021-00-6	202-479-3	96-12-8	

		↓ 2003/36/EF, artikel 1		
2-Brompropan	602-085-00-5	200-855-1	75-26-3	E

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
Warfarin; 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-coumarin	607-056-00-0	201-377-6	81-81-2	
Bly-2,4,6-trinitroresorcinolat; blystyphnat	609-019-00-4	239-290-0	15245-44-0	

⌦ Tillæg 6 ⌫

Punkt ~~31~~ ⌦ 30 ⌫ — Reproduktionstoksiske stoffer: kategori 2

Stoffer	Indeksnummer	EF-nummer	CAS-nummer	Noter
		↓ 2001/41/EF, artikel 1, nr. 2		
6-(2-chloroethyl)-6(2-methoxyethoxy)-2,5,7,10-tetraoxa-6-silaundecan; etacelasil	014-014-00-X	253-704-7	37894-46-5	
		↓ 2003/36/EF, artikel 1		
Flusilazol (ISO); Bis(4-fluorphenyl)(methyl)(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-silan	014-017-00-6	—	85509-19-9	E
Blanding af: 4-[[bis-(4-fluorphenyl)-methylsilyl]methyl]-4H-1,2,4-triazol; 1-[[bis-(4-fluorphenyl)methylsilyl]-1H-1,2,4-triazol	014-019-00-7	403-250-2	—	E
		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
Tetracarbonylnikkel; carbonylnikkel	028-001-00-1	236-669-2	13463-39-3	
		↓ 2003/34/EF, artikel 1		
Cadmiumfluorid	048-006-00-2	232-222-0	7790-79-6	
Cadmiumchlorid	048-008-00-3	233-296-7	10108-64-2	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)

Benzo[a]pyren; benzo[d,e,f]chrysen	601-032-00-3	200-028-5	50-32-8	
2-methoxyethanol; methylglykol;	603-011-00-4	203-713-7	109-86-4	
2-ethoxyethanol; ethylglykol	603-012-00-X	203-804-1	110-80-5	

↓ 2003/34/EF, artikel 1

2,3-Epoxypropan-1-ol; glycidol	603-063-00-8	209-128-3	556-52-5	

↓ 2003/34/EF, artikel 1

2-Methoxypropanol	603-106-00-0	216-455-5	1589-47-5	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Bis(2-methoxyethyl)ether	603-139-00-0	203-924-4	111-96-6	
R-2,3-Epoxy-1-propanol	603-143-002	404-660-4	57044-25-4	E

↓ 2003/34/EF, artikel 1

4,4'-Isobutylethylidendiphenol; 2,2-bis (4'-hydroxyphenyl)-4-methylpentan	604-024-00-8	401-720-1	6807-17-6	

		↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2 (tilpasset)		
2-methoxyethylacetat; ⌦ ethylenglycol monomethyletheracetat; ⌫ methylglykolacetat	607-036-00-1	203-772-9	110-49-6	
2-ethoxyethylacetat; ⌦ ethylenglycol monomethyletheracetat; ⌫ ethylglykolacetat	607-037-00-7	203-839-2	111-15-9	
2-ethylhexyl-[[[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]methyl]thio] acetat	607-203-00-9	279-452-8	80387-97-9	
		↓ 1999/43/EF, artikel 1		
bis (2-methoxyethyl) phthalat	607-228-00-5	204-212-6	117-82-8	
		↓ 2003/34/EF, artikel 1		
2-Methoxypropylacetat	607-251-00-0	274-724-2	70657-70-4	
		↓ 2003/36/EF, artikel 1		
Fluazifop-butyl (ISO); Butyl (RS)-2-[4-(5-trifluormethyl-2-pyridyloxy)phenoxy]propianat	607-304-00-8	274-125-6	69806-50-4	
Vinclozolin (ISO); N-3,5-dichlorphenyl-5-methyl-5-vinyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion	607-307-00-4	256-599-6	50471-44-8	
Methoxyeddikesyre	607-312-00-1	210-894-6	625-45-6	E
Bis(2-ethylhexyl)phthalat; Di-(2-ethylhexyl)phthalat;	607-317-00-9	204-211-0	117-81-7	

DEHP				
Dibutylphthalat; DBP	607-318-00-4	201-557-4	84-74-2	
(+/-) Tetrahydrofurfuryl-(R)-2-[4-(6-chlorchinoxalin-2-yloxy)phenyloxy]propanoat	607-373-00-4	414-200-4	119738-06-6	E

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

Binapacryl (ISO); 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenyl-3-methylcrotonat	609-024-00-1	207-612-9	485-31-4	
Dinoseb; 2-(1-methyl-n-propyl)-4,6-dinitrophenol	609-025-00-7	201-861-7	88-85-7	
Salte og estere af dinoseb, undtagen sådanne nævnt andetsteds i dette bilag	609-026-00-2			
Dinoterb; 2-tert-butyl-4,6-dinitrophenol	609-030-00-4	215-813-8	1420-07-1	
Salte og estere af dinoterb	609-031-00-X			
Nitrofen (ISO); 2,4-dichlorphenyl-4-nitrophenylether	609-040-00-9	217-406-0	1836-75-5	
(Methyl-ONN-azoxy)methylacetat; (methylazoxymethyl)acetat	611-004-00-2	209-765-7	592-62-1	

↓ 2003/34/EF, artikel 1

Tridemorph (ISO); 2,6-dimethyl-4-tridecylmorpholin	613-020-00-5	246-347-3	24602-86-6	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

Ethylenthiourinstof;	613-039-00-9	202-506-9	96-45-7	

imidazolidin-2-thion				

↓ 2003/34/EF, artikel 1

Cycloheximid	613-140-00-8	200-636-0	66-81-9	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

Flumioxazin (ISO); N-(7-fluor-3,4-dihydro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)cyclohex-1-en-1,2-dicarboximid	613-166-00-X	—	103361-09-7	
(2RS,3RS)-3-(2-chlorophenyl)-2-(4-fluorphenyl)-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-methyl]oxiran	613-175-00-9	406-850-2	106325-08-0	

↓ 97/56/EF, artikel 1, nr. 2

N,N-dimethylformamid	616-001-00-X	200-679-5	68-12-2	

↓ 2003/36/EF, artikel 1

N, N-dimethylacetamid	616-011-00-4	204-826-4	127-19-5	E
Formamid	616-052-00-8	200-842-0	75-12-7	
N-methylacetamid	616-053-00-3	201-182-6	79-16-3	
N-methylformamid	616-056-00-X	204-624-6	123-39-7	E

↓ 83/478/EØF, artikel 3 (nyt) (tilpasset)
→1 85/467/EØF, artikel 1, stk. 2, første led

~~BILAG II~~ ⌦ Tillæg 7 ⌫

→1 ~~A.~~ ← SÆRLIGE BESTEMMELSER VEDRØRENDE MÆRKNING AF ASBESTHOLDIGE ~~produkter~~ ⌦ ARTIKLER ⌫

1. Asbestholdige ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ eller deres emballage skal være forsynet med den nedenfor beskrevne etiket:

   a) etiketten skal være udformet efter nedenstående model og være mindst 5 cm høj (H) og 2,5 cm bred;

   b) den består af to dele:

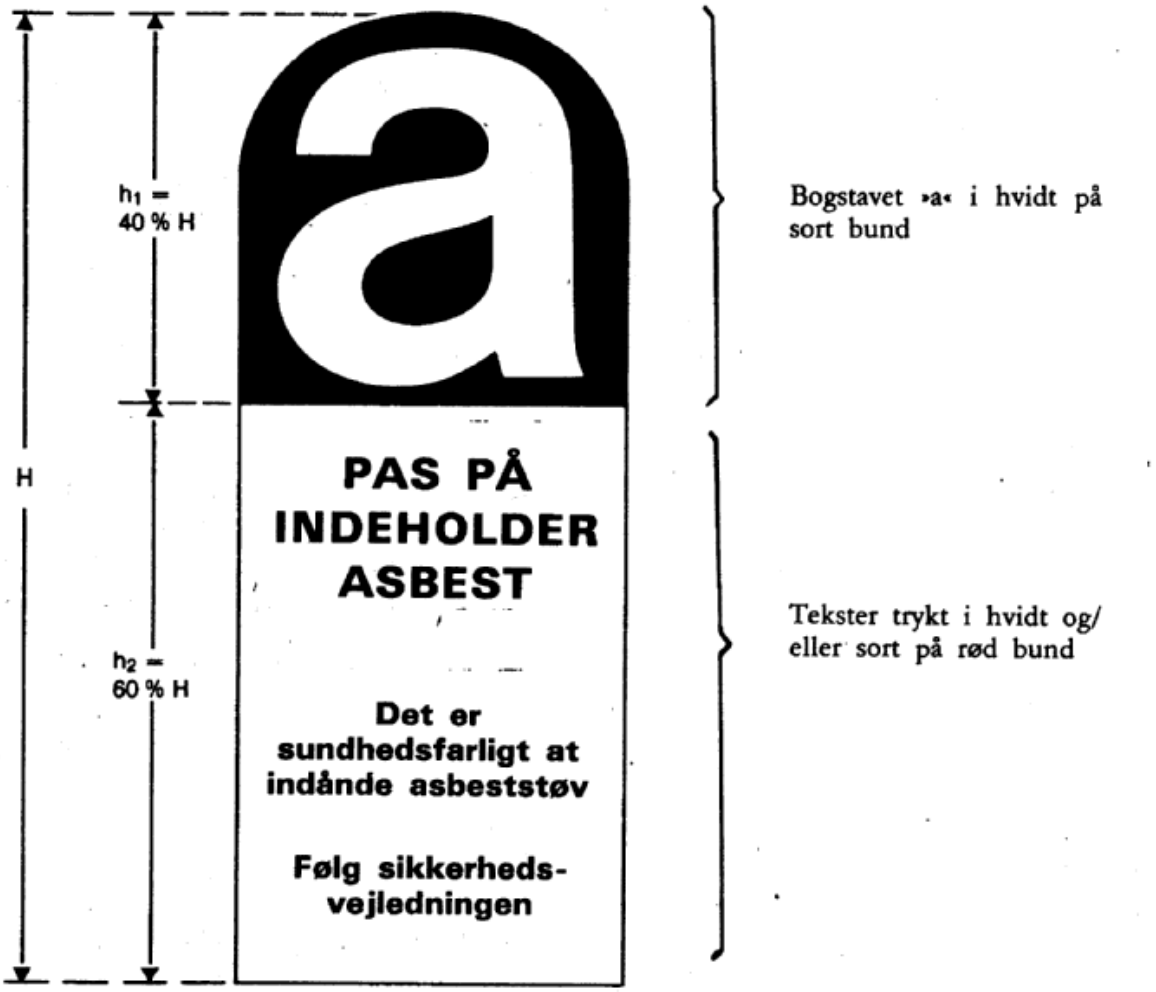
      – den øverste del (h_1 = 40 % H) består af bogstavet «a» i hvidt på sort bund,

      – den nederste del (h_2 = 60 % H) indeholder en klart læselig tekst i sort og/eller hvidt på rød bund;

   c) såfremt ~~produktet~~ ⌦ artiklen ⌫ indeholder crocidolit, skal der i stedet for «indeholder asbest» stå «indeholder crocidolit/blå asbest».

      Medlemsstaterne kan undtage ~~varer~~ ⌦ artikler ⌫ , der er bestemt til markedsføring på deres område, fra bestemmelserne i første afsnit. Etiketten på disse ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ skal dog være forsynet med angivelsen «indeholder asbest»;

   d) hvis mærkningen sker ved trykning direkte på ~~produktet~~ ⌦ artiklen ⌫ , er det tilstrækkeligt, at én farve står i kontrast til bundfarven.



2. Etiketten skal anbringes i overensstemmelse med nedenstående regler:

a) på hver enkelt af de mindste leverede enheder;

b) hvis ~~et produkt~~ ⌦ en artikel ⌫ omfatter dele fremstillet af asbest, er det tilstrækkeligt, at disse dele forsynes med etiketten. Mærkningen er ikke nødvendig, såfremt det på grund af små dimensioner eller uegnet emballage ikke er muligt at anbringe en etiket på ~~produktet~~ ⌦ den pågældende del ⌫ .

3. Mærkning af emballerede, asbestholdige ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫

3.1. Emballerede, asbestholdige ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ skal forsynes med et klart læseligt, uforgængeligt mærke med følgende oplysninger:

a) symbolet for farerne og angivelse af disse i overensstemmelse med dette bilag;

b) sikkerhedsvejledning, der skal udvælges i overensstemmelse med angivelserne i dette bilag, for så vidt som den er nødvendig for ~~det~~ ⌦ den ⌫ pågældende ~~produkt~~ ⌦ artikel ⌫ .

Såfremt der gives yderligere sikkerhedsoplysninger på emballagen, må disse ikke afsvække eller være i modstrid med de under litra a) og b) omhandlede anvisninger.

3.2. Den under punkt 3.1 omhandlede mærkning skal

– ske på en etiket, der påklæbes solidt på emballagen, eller

– spå en løs etiket, der er forsvarligt fastgjort til emballagen, eller

– ske ved trykning direkte på emballagen.

3.3. Asbestholdige ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , der kun er emballeret i plast eller lignende, anses for emballerede ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ , og skal mærkes i overensstemmelse med punkt 3.2. Når ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ udtages særskilt fra sådanne emballager og markedsføres uemballerede, skal hver enkelt af de mindste leverede enheder ledsages af en notits mærket i overensstemmelse med punkt 3.1.

4. Mærkning af uemballerede, asbestholdige ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫

For så vidt angår uemballerede, asbestholdige ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ skal mærkningen i overensstemmelse med punkt 3.1 foregå ved hjælp af

– en etiket, der påklæbes solidt på ~~det~~ ⌦ den ⌫ asbestholdige ~~produkt~~ ⌦ artikel ⌫ , eller

– en løs etiket, der er forsvarligt fastgjort til ~~dette produkt~~ ⌦ denne artikel ⌫ , eller

– ved trykning direkte på ~~produktet~~ ⌦ artiklen ⌫ ,

eller, når ovennævnte fremgangsmåder ikke på rimelig vis kan anvendes, som for eksempel på grund af ~~produktets~~ ⌦ artiklens ⌫ begrænsede dimensioner, almindelige uegnethed eller visse tekniske vanskeligheder, en medfølgende notits mærket i overensstemmelse med punkt 3.1.

5. ~~Med forbehold af fællesskabsbestemmelserne~~ ⌦ Medmindre andet er fastsat i andre fællesskabsbestemmelser ⌫ om sikkerhed og hygiejne på arbejdspladsen, bør etiketten på ~~det produkt~~ ⌦ den artikel ⌫ , som i forbindelse med sin anvendelse kan forarbejdes eller bearbejdes, ledsages af relevant sikkerhedsvejledning vedrørende ~~det~~ ⌦ den ⌫ pågældende ~~produkt~~ ⌦ artikel ⌫ , f.eks. følgende:

– arbejdet bør så vidt muligt foregå i fri luft eller i et godt ventileret lokale;

– der bør fortrinsvis anvendes håndværktøj eller værktøj med lavt omdrejningstal, der om nødvendigt er udstyret med en anordning til opsamling af støv; når der anvendes værktøj med højt omdrejningstal, bør det altid være udstyret med sådanne anordninger;

– fugtes om muligt, inden der skæres eller bores;

– støvet fugtes og opsamles i en beholder, der lukkes omhyggeligt og bortskaffes på en sikkerhedsmæssigt forsvarlig måde.

6. Mærkningen af ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ til brug i hjemmet, som ikke er omfattet af punkt 5, og som ved anvendelse kan afgive asbestfibre, ~~bør~~ ⌦ skal ⌫ om

nødvendigt indeholde følgende sikkerhedsvejledning: «udskiftes i tilfælde af slitage».

7. ~~Medlemsstaterne kan gøre markedsføring~~ ⌦ Mærkningen ⌫ af asbestholdige ~~produkter~~ ⌦ artikler ⌫ ~~på deres område betinget af, at etiketten er~~ ⌦ skal være ⌫ affattet på ~~deres respektive~~ ⌦ det eller de ⌫ officielle sprog ⌦ i den medlemsstat eller de medlemsstater, hvor artiklen markedsføres ⌫ .

↓ 2003/3/EF, artikel 1 og bilag, andet led (tilpasset)

⌦ Tillæg 8 ⌫

Punkt 43 — Azofarvestoffer

Liste over aromatiske aminer

	CAS-nummer	Indeksnummer	EF-nummer	Stof
1	92-67-1	612-072-00-6	202-177-1	biphenyl-4-amin 4-aminobiphenyl xenylamin
2	92-87-5	612-042-00-2	202-199-1	benzidin
3	95-69-2		202-441-6	4-chlor-o-toluidin
4	91-59-8	612-022-00-3	202-080-4	2-naphthylamin
5	97-56-3	611-006-00-3	202-591-2	o-aminoazotoluen 4-amino-2',3-dimethylazobenzen 4-o-tolylazo-o-toluidin
6	99-55-8		202-765-8	5-nitro-o-toluidin
7	106-47-8	612-137-00-9	203-401-0	4-chloranilin
8	615-05-4		210-406-1	4-methoxy-m-phenylendiamin
9	101-77-9	612-051-00-1	202-974-4	4,4'-methylendianilin 4,4'-diaminodiphenylmethan
10	91-94-1	612-068-00-4	202-109-0	3,3'-dichlorbenzidin 3,3'-dichlorbiphenyl-4,4'-diamin
11	119-90-4	612-036-00-X	204-355-4	3,3'-dimethoxybenzidin o-dianisidin
12	119-93-7	612-041-00-7	204-358-0	3,3'-dimethylbenzidin 4,4'-bis-o-toluidin

13	838-88-0	612-085-00-7	212-658-8	4,4'-methylendi-o-toluidin
14	120-71-8		204-419-1	6-methoxy-m-toluidin p-cresidin
15	101-14-4	612-078-00-9	202-918-9	4,4'-methylen-bis-(2-chloranilin) 2,2'-dichlor-4,4'-methylendianilin
16	101-80-4		202-977-0	4,4'-oxydianilin
17	139-65-1		205-370-9	4,4'-thiodianilin
18	95-53-4	612-091-00-X	202-429-0	o-toluidin 2-aminotoluen
19	95-80-7	612-099-00-3	202-453-1	4-methyl-m-phenylendiamin
20	137-17-7		205-282-0	2,4,5-trimethylanilin
21	90-04-0	612-035-00-4	201-963-1	o-anisidin 2-methoxyanilin
22	60-09-3	611-008-00-4	200-453-6	4-amino-azobenzen

⌦ Tillæg 9

Punkt 43 — Azofarvestoffer ⌫

Liste over azofarvestoffer

	CAS-nummer	Indeksnummer	EF-nummer	Stof
1	Ikke tildelt Bestanddel 1: CAS-nr.: 118685-33-9 $C_{39}H_{23}ClCrN_7O_{12}S.2Na$ Bestanddel 2: $C_{46}H_{30}CrN_{10}O_{20}S_2.3Na$	611-070-00-2	405-665-4	Blanding af: dinatrium (6-(4-no)-3-sulfonato-2-(3,5-dinitro-2-oxidophenylazo)-1-naphtholato)(1-(5-chlor-2-oxidophenylazo)-2-naphtholato)chromat(1-); trinatriumbis(6-(4-anisidino)-3-sulfonato-2-(3,5-dinitro-2-oxidophenylazo)-1-naphtholato)chromat(1-)

BILAG XVII

PERSISTENTE ORGANISKE MILJØGIFTE (POP)

STOF (CAS-nummer)	BEGRÆNSNINGER
1. Aldrin CAS-nr.: 309-00-2 Einecs-nr.: 206-215-8 2. Chlordan CAS-nr.: 57-74-9 Einecs-nr.: 200-349-0 3. Dieldrin CAS-nr.: 60-57-1 Einecs-nr.: 200-484-5 4. Endrin CAS-nr.: 72-20-8 Einecs-nr.: 204-079-4 5. Heptachlor CAS-nr.: 76-44-8 Einecs-nr.: 200-962-3 6. Hexachlorbenzen CAS-nr.: 118-74-1 Einecs-nr.: 204-273-9 7. Mirex CAS-nr.: 2385-85-5 Einecs-nr.: 219-196-6 8. Toxaphen CAS-nr.: 8001-35-2 Einecs-nr.: 232-283-3 9. DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan) CAS-nr.: 50-29-3 Einecs-nr.: 200-024-3 10. Chlordecon CAS-nr.: 143-50-0 11. Hexabrombiphenyl CAS-nr.: 36355-01-8	Må ikke produceres, markedsføres eller anvendes alene, i præparater eller i artikler
12. Polychlorerede biphenyler (PCB)	Må ikke produceres, markedsføres eller anvendes alene, i præparater eller i genstande Efter særlig tilladelse og med forbehold af Rådets direktiv 96/59/EF kan genstande, som indeholder eller består af disse stoffer og allerede er i brug på det tidspunkt, hvor denne forordning træder i kraft, fortsat anvendes.
13. HCH	1. Teknisk HCH må ikke anvendes, undtagen som

CAS-nr.: 608-73-1, herunder lindan (CAS-nr.: 58-89-9)	mellemprodukt i kemisk produktion. 2. Genstande, i hvilke mindst 99 % af HCH-isomeren er af gamma-formen (lindan), må ikke anvendes, undtagen beskyttelse af folkesundheden og som topisk insekticid til veterinær anvendelse. 3. Som undtagelse fra punkt a og b er følgende anvendelser tilladt indtil [1.1.2006]: a) Erhvervsmæssig forebyggende og industriel behandling af tømmer og kævler; b) Anvendelse indendørs, i industri og i boligbyggeri.

FINANSIERINGSOVERSIGT TIL FORSLAGET

Politikområde(r): 02 – VIRKSOMHEDER

Aktivitet(er): 04 – BEDRE FUNKTION AF DET INDRE MARKED

TILTAGETS TITEL: 04 – DEN NYE KEMIKALIELOVGIVNING (REACH) OG OPRETTELSE AF ET KEMIKALIEAGENTUR

1. BUDGETPOST (NUMMER OG BETEGNELSE)

Ny post – Den nye kemikalielovgivning (REACH) og oprettelse af et kemikalieagentur

2. SAMLEDE TAL

2.1. Samlet rammebevilling (del B): forpligtelser, millioner €

Gennem tiltagets 11-årige varighed forventes tilskuddet fra EU til dækning af underskuddet at udgøre ca. 78,8 millioner €, svarende til ca. 22 % af agenturets samlede budget (jf. bilag 1, 2).

2.2. Gyldighedsperiode:

Tiltagets varighed er 11 år (2006 – 2016). Størstedelen af det arbejde, som den nye kemikalielovgivning (REACH) medfører for agenturet, består i registrering af såkaldte "indfasningsstoffer". Dette skulle være fuldført inden for 11 år efter lovgivningens ikrafttræden. Derefter vil agenturet (med et mindre personale) fortsat udføre sine funktioner bestående i registrering af nye stoffer og ydelse af teknisk og videnskabelig vejledning til Kommissionen, medlemsstaterne og industrien.

Den vejledende tidsplan (som forudsætter, at forordningen træder i kraft i 2006), er følgende:

År	Betegnelse	Beskrivelse
2003 – 2005	Mellem-perioden	I denne periode, der begynder med Kommissionens vedtagelse og forsætter indtil forordningens ikrafttræden, vil der blive iværksat forskellige forberedende tiltag med henblik på, at den nye kemikalielovgivning kan blive administreret effektivt, så snart den træder i kraft.
2006 - 2007	Overgangs-periode (indtil 18 måneder)	I henhold til den foreslåede forordning (artikel 131) varetager Kommissionen agenturets funktioner i perioden efter forordningens ikrafttræden, indtil disse funktioner er overført til agenturet. Kommissionen overfører disse funktioner til agenturet senest to måneder efter at have modtaget underretning fra agenturets direktør om, at agenturet er klar til at påtage sine opgaver i henhold til denne forordning, dog senest 18 måneder efter forordningens ikrafttræden.
2008 – 2016-7	Det fuldt funktions-	Ifølge forordningens artikel 73 vil agenturet blive midtpunkt for driften af REACH-systemet.

	dygtige agen-tur	

2.3. Samlet flerårigt skøn over udgifterne:

(a) Fortegnelse over forpligtelsesbevillinger/betalingsbevillinger (finansieringsstøtte) (se punkt 6.1.1)

millioner € (med tre decimaler)

	2004 *	2005 *	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Forplig-telser	0	0	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0
Betalin-ger	0	0	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0
	Forbere-dende Tiltag		**Overgangs-Periode**										

(b) Udgifter til teknisk og administrativ bistand og support *(se punkt 6.1.2)*

For-pligtelser	3000	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Betalin-ger	3000	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal a+b													
For-pligtelser	3000	4,000	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0
Betalin-ger	3000	4,000	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0

(c) Samlede finansielle virkninger af personaleforbruget og andre administrative omkostninger *(se punkt 7.2 og 7.3)*

For-pligtelser	0,050	0,050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Betalin-ger	0,050	0,050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL a+b+c													
For-pligtelser	3.050	4.050	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0

Betalin-ger	3.050	4.050	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0

- 2004 og 2005 er kun medtaget til orientering, da forordningen tidligst træder i kraft januar 2006. Der kræves dog en række forberedende tiltag for at sikre, at det nye kemikalieagentur er funktionsdygtigt til denne dato.

2.4. Forenelighed med den finansielle programmering og de finansielle overslag

[X] Forslaget vil medføre omprogrammering af den pågældende budgetpost i det finansielle overslag.

2.5. Virkninger for budgettets indtægtsside:

[X]* Ingen (vedrører tekniske aspekter ved en foranstaltnings gennemførelse).

Der er ingen påvirkning af indtægtssiden af Fællesskabets budget. I agenturets budget er opført egne indtægter. bestående af gebyrer, som betales af industrien for registrering og godkendelse, og som agenturet er bemyndiget til at opkræve i medfør af de opgaver, det er pålagt, samt et tilskud fra Fællesskabsbudgettet til dækning af underskuddet.

Af hensyn til variationerne i gebyrindtægterne og dermed i tilskuddet fra EU til dækning af underskud bør agenturet i medfør af artikel 185 i den finansielle forordning for Kommissionen gives mulighed for[1] med forudgående samtykke fra Kommissionen som led i sin egen finansielle styring at oprette en reservefond bestående af overskydende gebyrindtægter.

3. BUDGETSPECIFIKATIONER

Udgifternes art		**Nye**	**EFTA-landenes deltagelse**	**Ansøgerlandenes deltagelse**	**Post i finansierings-overslag**
Ikke-obliga-toriske	Diff	Ja	Nej	Nej	**Nej** [3]

4. RETSGRUNDLAG

Traktatens artikel 95 er det mest hensigtsmæssige retsgrundlag, fordi der bør sikres lige muligheder for alle økonomiske aktører på det indre marked samtidig med et højt niveau af sundheds- og miljøbeskyttelse.

5. BESKRIVELSE OG BEGRUNDELSE

5.1. Behov for fællesskabsforanstaltninger

REACH

Den 27. februar 2001 udsendte Kommissionen en hvidbog[2] om en strategi for en ny kemikaliepolitik.

---

1 KOM (2002) 1605 af 25. juni 2002

2 KOM (2001) 88 endelig

Behovet for en ny strategi fremgik af en udbredt erkendelse af, at den eksisterende lovgivning ikke i tilstrækkelig grad imødekommer den europæiske offentligheds betænkelighed ved kemikaliers potentielle indvirkning på sundhed og miljø, og at den fremover vil have stadig vanskeligere ved at opfylde forventningerne.

Skønt den eksisterende lovgivning indfører et betydeligt antal risikobegrænsende foranstaltninger for visse farlige stoffer, anses den ikke for at modsvare kravene i det nye århundrede. Navnlig sørger den ikke for tilstrækkelige oplysninger om egenskaberne af "eksisterende" kemikalier (markedsført første gang inden 1981), som er dominerende på Fællesskabets marked, den er ikke i stand til at skaffe risikovurderinger og efterfølgende nødvendige begrænsninger inden for en rimelig tidsramme, og den lægger for stor en del af bevisbyrden for risikoen over på offentlige myndigheder. Endnu et vigtigt argument for at modernisere systemet er det forhold, at kravene til nye kemiske stoffer, der bringes på markedet, er langt strammere end til "eksisterende" stoffer.

Agenturet

Agenturet bliver en uafhængig myndighed, der administrerer det nye REACH-system, og vil få en vigtig rolle i at sikre systemets troværdighed over for alle interesserede parter og offentligheden. Ud fra hensyn til effektivitet, kontinuitet og optimal udnyttelse af foreliggende ressourcer er det her forudsat, at Ispra, Italien (det nuværende hjemsted for Det Europæiske Kemikaliebureau) vil være det mest hensigtsmæssige hjemsted for agenturet.

Fordelen ved at inddrage Kommissionen gennem det nye kemikalieagentur består i, at der bliver tale om centraliseret indsamling af oplysninger om kemikalier [hvilket hidtil ikke har fundet sted]. Sådanne oplysninger vil danne et solidt grundlag for Kommissionens afgørelser, og ikke-fortrolige oplysninger vil blive stillet til rådighed for alle interesserede parter på anmodning eller i form af en database. Desuden vil agenturet blive midtpunkt for udveksling af oplysninger mellem medlemsstaternes kompetente myndigheder og vil sikre, at bedste praksis deles.

Kommissionen vil have beføjelse til at træffe alle afgørelser om godkendelse og begrænsning af farlige stoffer ved hjælp af komitologiproceduren baseret på de udtalelser, der udarbejdet af agenturet. Kommissionen træffer desuden afgørelser om forslag til yderligere testning (hvis medlemsstaterne ikke kan nå til enighed), om medtagelse af stoffer i godkendelsessystemet og om harmonisering af klassificering og mærkning.

5.1.1. Mål

Målsætningen for REACH

Kommissionens strategi for en ny kemikaliepolitik indgår i Kommissionens bredere strategi for bæredygtig udvikling. Kommissionens overordnede målsætning er således at tage hensyn til bæredygtig udvikling ved dels at sikre en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og af miljøet, dels den kemiske industris konkurrenceevne i rammerne af det indre marked. De særlige mål for REACH er følgende:

– beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet;

– fastholdelse og styrkelse af konkurrenceevnen af EU's kemiske industri;

– undgåelse af opsplitning af det indre marked;

– større gennemsigtighed;

– samordning med det internationale arbejde;

– fremme af testning uden brug af forsøgsdyr;

– efterkommelse af EU's internationale forpligtelser under WTO.

Agenturets målsætning

Agenturet koordinerer ressourcerne hos medlemsstaternes kompetente myndigheder inden for Reach-systemet. Denne koordinerende rolle er - i modsætning til at give agenturet rollen som paneuropæisk forskriftsudstedende myndighed - i overensstemmelse med nærhedsprincippet.

Agenturet forelægger udtalelserne for Kommissionen, før der træffes afgørelser i sagerne. For at sikre, at den dokumentation, der forelægges medlemsstaterne, er komplet, vil agenturet få beføjelse til at anmode om supplerende oplysninger.

Endvidere vil de interesserede parter blive underrettet om de udtalelser, som vil blive afgivet, og vil få lejlighed til at fremsætte kommentarer til dem. Kommentarerne fremsendes til Kommissionen sammen med de pågældende udtalelser, hvorved parterne sikres retten til forsvar.

Indikatorer

På grund af manglende oplysninger er fuldstændig kvantitativ dækning af kemiske stoffers påvirkning af miljøet og menneskers sundhed ikke mulig. Faktisk vil sådanne oplysninger for en stor dels vedkommende først foreligge, når de kemiske stoffer, der markedsføres i dag, er blevet registreret i henhold til REACH kravene. Den gavnlige virkning af REACH vil derfor først indfinde sig på længere sigt.

Den konsekvensvurdering, der er udført for den foreslåede kemikaliestrategi, viser, at Kommissionens lovforslag repræsenterer en afbalanceret tilgang til emnet. Den vil:

i) bidrage til bedre sundhed for EU's borgere og bedre beskyttelse af miljøet

ii) forbedre sikkerheden på arbejdspladserne, og

iii) skabe bedre betingelser for innovation ved at gøre det lettere og billigere at udvikle nye og sikrere kemisk stoffer og, gennem begrænsning af omkostningerne, medvirke til fastholdelse af den kemiske industris konkurrenceevne.

Alle de forskellige virkninger af den nye politik (se konsekvensvurdering) må løbende overvåges for at sikre et afbalanceret resultat af gennemførelsen af den nye lovgivning i overensstemmelse med kravene i strategien for bæredygtig udvikling. For at dette skal være muligt, er der i konsekvensvurderingen fastlagt et sæt indikatorer.

Formål	Indikatorer for politikken

Beskyttelse af menneskers sundhed og miljøet;	• Medlemsstaternes rapporter om de evalueringer af dokumentation vedrørende forslag til forsøg, som er gennemført det foregående år.[3]
	  • Antal dyreforsøg, der er udført efter foregående evaluering af dokumentation
	  • Antal forslag til dyreforsøg, der er afvist efter foregående evaluering af dokumentation
	• Medlemsstaternes indberetninger om aktiviteter til håndhævelse[4]
	• Antal PBT-stoffer[5], vPvB-stoffer[6] og CMR-stoffer[7] udpeget

Harmonisering af evalueringssystemet	• Antal udkast til evalueringsafgørelser, der henvises til agenturets medlemsstatsudvalg
Fastholdelse og styrkelse af konkurrenceevnen af EU's kemiske industri	• Antal virksomheder, der er aktive i kemikaliesektoren (og SMV'ers andel heraf) • Udviklingen i den europæiske kemiske industris eksport/import • Den kemiske sektors bidrag til BNP og dens værditilvækst • Beskæftigelsen i den kemiske sektor
Fremme af innovation	• Antal registrerede nye stoffer • Antal PPORD[8] som er ansøgt
Undgåelse af opsplitning af det indre marked	• Antal artikel 95-sager
Større gennemsigtighed	• Antal søgninger i databaserne • Antal anmodninger om ikke-fortrolige oplysninger

3 I forordningens artikel 51 hedder det 'Medlemsstaternes forpligtelse til at indberette til agenturet - For at sikre en rimelig fordeling af byrderne udarbejder hver medlemsstat en årlig beretning om de evalueringer af dokumentation vedrørende forslag til forsøg, som er gennemført det foregående år'.

4 I forordningens artikel 123 fastslås, at 'Ved indberetning forstås, at medlemsstaterne indberetter om deres håndhævelsesaktiviteter og de sanktioner, der er pålagt for manglende overensstemmelse i løbet af det foregående kalenderår. Sådanne oplysninger vil være nyttige for forummet, når dette skal udpege tiltag, som det kan være hensigtsmæssigt at træffe på fællesskabsplan'.

5 persistente, bioakkumulerende og giftige stoffer

6 stoffer, der er meget langsomt nedbrydelige og i særlig grad ophobes i organismer

7 Carcinogene, mutagene og reproduktionstoksiske stoffer

8 Produkt- og procesorienteret udvikling

Fremme af testning uden brug af forsøgsdyr	• Rådighed over valide QSAR'er[9] • Antal in-vitro forsøgsmetoder, som er udviklet • Antal hvirveldyr anvendt i dyreforsøg i forhold til antal udførte forsøg
Efterkommelse af EU's internationale forpligtelser under WTO	• Antal sager vedrørende TBT[10]
Rettidig indførelse af risikobegrænsende foranstaltninger	• Antal behandlede sager om godkendelse/begrænsning • Tidsrum fra et komplet sæt dokumentation modtages, til der opnås enighed om betryggende risikobegrænsende foranstaltninger
Omkostningseffektivitet af den centrale registreringsprocedure	• Antal sæt registreringsdokumentation modtaget fra industrien • Antal afviste sæt registreringsdokumentation (fuldstændighedskontrol)
Korrektheden af agenturets afgørelser	• Antal modtagne appeller • Antal appeller taget til følge

Før REACH træder i kraft, vil der blive gennemført en 'base-line' undersøgelse til fastlæggelse af

- Hyppighed og art af kemisk påført sygelighed hos
  - forbrugere (offentligheden)
  - arbejdstagere (generelt)
  - arbejdstagere (kemisk industri)
- Hyppighed og art af miljøskader forårsaget af kemiske stoffer

Denne base-line undersøgelse vil desuden udpege relevante sociale og økonomiske faktorer, som kan have betydning derfor. Samme indikatorer og metoder vil hvert n'te år blive anvendt til påvisning af ændringer i sådanne hændelser og de sociale og økonomiske faktorer, der er udpeget i base-line undersøgelsen.

5.1.2. Dispositioner der er truffet på grundlag af forhåndsevalueringen

Den foreslåede lovgivning udgør en mere omfattende fremgangsmåde med mange nye funktioner, men har på flere områder stærk lighed med tidligere fællesskabspolitikker. Man kan derfor trække på tidligere erfaringer og specielt på den viden og de færdigheder der ligger i ECB, således vedrørende den tid, forskellige arbejdsopgaver kræver, og hvordan det fastlægges, om yderligere testning er nødvendig. Det er hensigten at udnytte disse erfaringer i de forberedende faser til REACH (se punkt 5.2.) så agenturet kan begynde at udføre sine opgaver, så snart den nye lovgivning er på plads.

---

[9] Kvalitative struktur-aktivitets relationer (alternativ testmetode)

[10] Tekniske handelshindringer

REACH

Kommissionen har lagt forskellige undersøgelser til grund ved udarbejdelse af en omkostningseffektiv og afbalanceret strategi. Disse undersøgelser er lagt ud på Kommissionens hjemmeside[11].

De interesserede parter er løbende blevet hørt lige fra de tidlige stadier i formuleringen af lovgivningen.

Selv inden hvidbogen blev vedtaget, afholdtes i februar 1999 en indledende brainstorming med over 150 interesserede parter - kontrollerende myndigheder, videnskabsfolk, industri, private miljø- og forbrugerorganisationer samt repræsentanter fra ansøgerlandene. Dette var med til at give Kommissionen lejlighed til at danne sig et samlet billede af problemerne og mulige løsninger.

Efter offentliggørelsen af hvidbogen fulgte en periode med en omfattende offentlig debat, hvor der indkom i hundredvis af skriftlige kommentarer fra interesserede parter om en række spørgsmål knyttet til det foreslåede nye system. Denne meningsudveksling fandt sted under konferencer, stakeholder-arbejdsgrupper og bilaterale kontakter mellem tjenestegrenene og de involverede parter. Desuden blev der iværksat særlige undersøgelser, navnlig vedrørende de forventede virkninger af det foreslåede system.

Både Ministerrådet og Parlamentet tilsluttede sig hvidbogens konklusioner, og derudover gav flere medlemsstater og visse tredjelande, således De Forenede Stater, særskilt udtryk for deres synspunkter.

I maj 2003 besluttede Kommissionen at afholde en internet-høring for at undersøge funktionsdygtigheden af den foreslåede lovgivning, herunder de tekniske krav. Høringen fandt sted mellem den 15. maj og 10. juli 2003. Der indkom over 6 000 indlæg. Nærmere oplysninger om internet-høringen og de øvrige høringer af interesserede parter findes på Kommissionens hjemmeside[12].

Agenturet

To muligheder blev overvejet for oprettelse af en ny "enhed" til administration af REACH. Den ene var at oprette et uafhængigt agentur, den anden at udvide Det Europæiske Kemikaliebureau (ECB). Til vurdering af disse to muligheder blev der foretaget en undersøgelse[13]. Efter tilbundsgående undersøgelse af de foreliggende muligheder nåede Kommissionen til den konklusion, at et uafhængigt agentur må foretrækkes.

Hovedfordelene er:

fuld støtte til agenturet fra alle involverede parter og dermed højere grad af forpligtelse til at få den nye strategi til at fungere;

---

11 http://europa.eu.int/comm/enterprise/chemicals/chempol/bia/index.htm

12 http://europa.eu.int/comm/enterprise/chemicals/chempol/whitepaper/whitepaper.htm

13 Se 'Feasibility study on resource requirements for a Central Entity', der er finansieret af Kommissionen og udført af Deloitte & Touche (slutrapport juni 2002), I hvidbogen om strategien for en ny kemikaliepolitik foreslog Kommissionen, at man udførte en forundersøgelse af denne enhed. Undersøgelsen gennemgik de to hovedmuligheder: et udvidet Europæisk Kemikaliebureau (ECB) i rammerne af Det Fælles Forskningscenter og et uafhængigt centralt agentur.

finansiering: et uafhængigt agentur kan anvende indtægter fra honorarer til at finansiere sit personale, hvilket ikke vil være tilfældet for et udvidet ECB. ECB ville være nødt til at overføre honorarerne til en reserveret budgetpost i del B af fællesskabsbudgettet;

gennemsigtighed udadtil: større tillid fra de interesserede parter til agenturet som et instrument med større gennemsigtighed;

kontinuitet på langt sigt;

administrativ effektivitet: ECB har først og fremmest en faglig baggrund og et fagligt mandat og er derfor ikke bedst egnet til at påtage sig opgaver, der hovedsagelig er af administrativ art;

mere aktiv inddragelse af medlemsstaterne med hensyn til ressourcer, forpligtelser og harmonisering af kontrolaktiviteter.

5.1.3. Dispositioner truffet på grundlag af den efterfølgende evaluering

Den foreslåede lovgivning er ny og erstatter derfor kun delvis eksisterende lovgivning. Der kan derfor ikke foretages en efterfølgende evaluering af tidligere lovgivning/programmer.

5.2. Indsatsområder og nærmere bestemmelser for støtten

5.2.1 Mål

Mellemperioden

I den såkaldte "mellemperiode", der begynder, når det nye agenturs udformning er fastlagt ved den foreslåede forordning (forventes at begynde inden udgangen af 2003 og fortsætte i 2004 og 2005), bliver der brug for en række forberedende tiltag med henblik på, at den nye kemikalielovgivning kan blive administreret effektivt, når den træder i kraft.

Overgangsperiode

Efter vedtagelse af lovgivningspakken vil agenturet være i den såkaldte 'overgangsperiode', hvor Kommissionen vil varetage agenturets rolle. Dette er valgt for at sikre, at agenturet er funktionsdygtigt og i stand til at ansætte personale og træffe afgørelser.[14]

Det fuldt funktionsdygtige agentur

I forordningens artikel 73 fastslås, at agenturet rådgiver medlemsstaterne og Fællesskabet vedrørende Reach-systemet.

5.2.2 Opgaver

Mellemperioden

Hovedopgaverne for taskforcen i mellemperioden består i grundig forberedelse af en (IT-) infrastruktur for agenturet og udarbejdelse af tekniske vejledninger til de interesserede parter. Som følge af det forventede store antal registreringer (af ca. 30 000 stoffer) forestiller man sig et halvautomatisk registreringssystem, der i vid udstrækning bygger på det nyeste inden for IT-infrastruktur.

---

[14] Tidligere erfaringer med oprettelse af andre agenturer har vist, at det uden en overgangsperiode er meget vanskeligt for dem at ansætte personale og blive funktionsdygtige, før der er ansat en eksekutivdirektør.

Derudover skal der udarbejdes detaljerede vejledninger for industrien og medlemsstaternes kompetente myndigheder med henblik på at sikre, at der indgives korrekte og komplette sæt dokumentation, når lovgivningen træder i kraft. Endvidere vil der som led i uddannelsesprocessen blive brug for at afholde informationsmøder for de interesserede parter (industrien og de kompetente myndigheder).

Alle opgaverne (herunder udformning af redskaber, som skal lette registreringsprocessen for industrien og redskaber til brug for medlemsstaterne ved varetagelse af deres opgaver) fastlægges i tæt samarbejde mellem GD Miljø, GD Erhvervspolitik og FFC på grundlag af et årligt arbejdsprogram. Derudover vil ECB fortsat yde faglig og teknisk bistand til GD Miljø til gennemførelse af den nuværende lovgivning, indtil denne ophæves af REACH. ECB's støtte til den nuværende lovgivning og til udarbejdelse af den nye lovgivning for perioden 2004-2006 vil blive ydet i det omfang, de foreliggende ressourcer gør det muligt. Dette arbejde vil blive omprioriteret, så at der i stigende grad kan frigøres ressourcer til arbejdet med forberedelse af REACH. Når den nye lovgivning er på plads, vil disse aktiviteter ophøre, så de pågældende stillinger bliver til rådighed for andre områder af FFC's arbejdsprogram.

Overgangsperiode

I henhold til den foreslåede forordning varetager Kommissionen agenturets funktioner i perioden efter forordningens ikrafttræden, indtil disse funktioner er overført til agenturet. Med henvisning til vigtigheden af kontinuitet i reglerne for kemiske stoffer foreslår Kommissionen, at agenturet placeres samme sted som det nuværende europæiske kemikaliebureau (ISPRA). Til at varetage disse funktioner vil det være nødvendigt at ansætte en kerne af erfarne medarbejdere. Det foreløbige udkast til agenturets budget er baseret på et samlet personaletal på 95 i år 1 og et gennemsnitligt antal på 200 de resterende år (bilag 4) bortset fra år 11[15] (hvor arbejdsbelastningen bliver specielt høj). For at sikre, at det kan lade sig gøre at ansætte så stort et antal medarbejdere, påregnes anvendt et mix af forskellige kontrakttyper: udsendte tjenestemænd, kontraktansatte, nyansatte tjenestemænd.

Der er gennemført en analyse af profilkrav. I overgangsperioden forventes tjenestemænd udstationeret fra de involverede tjenester i Kommissionen med henblik på administrative opgaver (f.eks. personale, økonomi/revision mv.). Til de mere teknisk prægede opgaver vedrørende agenturets (videnskabelige) kernefunktioner forventer man at arbejde med kontraktansatte og nyansatte embedsmænd. (EPSO er ved at udarbejde en faglig udvælgelsesprøve til 2004, som skulle resultere i en reserveliste i 2005).

5.3. Gennemførelsesmetoder

Forslaget omfatter etablering af et agentur i en indledende periode af 11 år. Agenturet vil få retssubjektivitet.

Agenturet vil blive etableret efter retningslinjerne i Kommissionens meddelelse om rammer for europæiske reguleringsorganer[16].

Agenturet vil omfatte følgende elementer:

– En bestyrelse bestående af 15 medlemmer;

---

15 I år 11 vil personalebehovet være maksimalt, idet der vil være behov for yderligere ~170 medarbejdere i lønklasse C til at uploade registreringsdokumentation i systemet. Dette arbejde kan udføres af midlertidigt ansatte, da det kun kræver meget få kvalifikationer (og dermed en meget kort oplæringsperiode) og er af begrænset varighed.

16 KOM(2002) 718 endelig

– En eksekutivdirektør, der rapporterer til bestyrelsen;

– Et udvalg vedrørende risikostyring, et udvalg vedrørende socio-økonomisk analyse og et medlemsstatsudvalg. Disse udvalg kan anmodes om at fremsætte udtalelser i forbindelse med evaluerings-, godkendelses- og begrænsningsprocedurer;

– Et forum for udveksling af oplysninger om håndhævelse. Dette forum gennemfører hvidbogens forslag om at etablere et formelt net af udøvende myndigheder. Forummets opgaver er i det væsentlige en fortsættelse af dem, der tidligere er varetaget af et uformelt net af medlemsstaternes myndigheder. Arbejdet på dette felt vil få gavn af at finde sted i et mere formelt net. Hver medlemsstat udnævner et medlem af forummet;

– Et sekretariat, der yder udvalgene teknisk og administrativ bistand. Det varetager desuden en række opgaver uden reference til udvalgene. Der er hovedsagelig tale om opgaver af administrativ art, som kræver begrænset teknisk viden. At inddrage udvalgene heri ville overbebyrde dem og ville ikke indebære nogen fordele;

– Et appelkammer, der behandler eventuelle appeller af agenturets afgørelser.

Budgetproceduren vil blive nærmere beskrevet i nedenstående artikler vedrørende agenturet:

Artikel 74, 79, 80, 93, 94, 97, 115.

6. FINANSIELLE VIRKNINGER

Agenturets budget omfatter dels egne indtægter, der består af alle gebyrer, som agenturet er bemyndiget til at opkræve i medfør af de opgaver, det er pålagt, dels et tilskud fra fællesskabsbudgettet til dækning af underskuddet. I det foreløbige budget (bilag 1, 2) for det nye kemikalieagentur forudsættes de første to år (2006 og 2007) finansieret næsten udelukkende over Fællesskabets budget. Da agenturets egne indtægter de to første år bliver ubetydelige, kræves et væsentligt tilskud til dækning af dets underskud for at sikre, at agenturet er funktionsdygtigt snarest muligt efter ikrafttræden af den nye lovgivning om kemiske stoffer (artikel 130). Gennem den 11-årige periode forventes tilskuddet fra EU til dækning af underskuddet at udgøre ca. 22 % af agenturets samlede budget (jf. bilag 1).

Hvad angår agenturets egne indtægter, bygger det foreløbige budget på en række forudsætninger (se bilag 3) vedrørende:

– antal registreringer, evalueringer og godkendelser, der kræves i henhold til den nye lovgivning.

– den tidsmæssige fordeling af registreringer, evalueringer og godkendelser inden for den 11-årige periode;

– agenturets arbejdsbelastning ved hver enkelt registrering, evaluering (kun af ringe omfang, da størstedelen af arbejdet vil blive foretaget af medlemsstaterne) og godkendelse;

– størrelsen af gebyret for hvert dokumentationssæt vedrørende registrering, evaluering og godkendelse.

Til brug ved opstilling af det foreløbige budget er der stillet forslag til størrelsen af de forskellige gebyrer. Når Kommissionen har overført de i denne forordning fastlagte funktioner til agenturet, vil bestyrelsen tage stilling til gebyrernes størrelse med henblik på at vurdere tilstrækkeligheden af den fremtidige finansiering (artikel 95). De skønnede gebyrsatser er følgende:

– Registrering af stoffer under 100 t => 400 €

– Registrering af stoffer over 100 t => 8000 €

– Evaluering af dokumentationssæt for stoffer over 100 t => agenturet godtgør indtil 5000 € af det modtagne registreringsgebyr til de kompetente myndigheder i medlemsstaterne, som foretager evalueringen (bemærkning: evaluering af kemiske stoffer godtgøres ikke).

Godkendelsesgebyr: 50.000 €

6.1. Samlede finansielle virkninger for budgettets del B - (hele programperioden)

6.1.1. Finansieringsstøtte

Forpligtelser (i millioner € med tre decimaler)

	2004 *	2005 *	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Tiltag 1 (tilskud fra Fællesskabet til det nye kemikalieagentur)	0	0	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0
I ALT	0	0	11.697	15.061	0	0	0	0	0	4.042	28.185	19.881	0

6.1.2. Teknisk og administrativ bistand, supportudgifter og IT-udgifter (forpligtelsesbevillinger)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
1) Teknisk og & administrativ bistand	1,050	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a) Kontorer for teknisk bistand	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b) Anden teknisk og administrativ bistand: - intern: - ekstern: *heraf til IT-kontrakter (udvikling)*	1,050		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal 1	1,050	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2) Udgifter til støtte *heraf udarbejdelse af skriftlige tekniske vejledninger* *heraf IT-hardware*	1,550 . . 0,100	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a) Undersøgelser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b) Ekspertmøder	0,220	0,350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
c) Information og publikationer	0,080	0,150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal 2	1,950	3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

I ALT	3000	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

7. VIRKNINGER FOR PERSONALERESSOURCER OG ADMINISTRATIONSUDGIFTER

7.1. Personalemæssige virkninger

Stillingstyper		Personale, som tilordnes administration af tiltaget, i form af bestående og/eller supplerende personale.		I alt	Beskrivelse af stillinger, der oprettes ved tiltaget
		Antal permanente stillinger **	Antal midlertidige stillinger		
Tjeneste-mænd eller midlertidigt ansatte	A B C				
Andet personale					
I alt					

Efter ikrafttrædelse af den nye lovgivning vil en af agenturets hovedopgaver være udarbejdelse af udtalelser, som efterfølgende vedtages ved komitologiproceduren. Det påregnede antal udtalelser forventes at medføre en ekstra arbejdsbelastning for GD Erhvervspolitik og GD Miljø. Det skønnes i øjeblikket, at der bliver brug for fire kontormedarbejdere (lønklasse A) (tre i GD Erhvervspolitik og en i GD Miljø). Dette behov må dækkes ved intern omgruppering i GD Miljø og GD Erhvervspolitik. Derudover bliver der behov for en finansmedarbejder (lønklasse B) til opfølgning og overvågning af aktiviteterne i det nye kemikalieagentur. Også dette behov må dækkes ved intern omgruppering.

7.2. Samlede finansielle virkninger af personaleforbruget

Personalets art	Beløb (€)	Beregningsmåde *
Tjenestemænd Tjenestemænd A Tjenestemænd B Midlertidigt ansatte	. . 0	Der forventes ingen direkte finansiel virkning af omprioriteringen af arbejdet i GD Erhvervspolitik og GD Miljø
Andet personale (angiv budgetpost)	0	

I alt	0	

7.3. Andre administrative udgifter som følge af foranstaltningen

Budgetpost (nummer og betegnelse)	Beløb i €	Beregningsmetode
Samlet bevilling (Afsnit A7) A0701 – Tjenesterejser A07030 – Møder A07031 – Udvalg, der skal høres[1] A07032 – Udvalg, som det ikke er obligatorisk at høre[1] A07040 – Konferencer A0705 – Undersøgelser og konsultationer Andre udgifter (specificeres)	50 000	. I den forberedende fase (2004 – 2005) forudsættes der at være behov for to årlige stakeholder-konferencer, der hver medfører omkostninger på 25 000 €. (5 talere @ 1 000 € hver + facilitet/frokost @ 20 000)
Informationssystemer (A-5001/A-4300)		
Andre udgifter – del A (specificeres)		
I alt	€50.000	

Beløbene modsvarer de samlede udgifter i en tolvmåneders periode.

[1] Det specificeres, hvilken udvalgstype der er tale om, og hvilken gruppe det tilhører.

I.	Samlet årligt beløb (7.2 + 7.3)
II.	Foranstaltningens varighed
III.	Foranstaltningens samlede omkostninger (I x II)

8. RESULTATOPFØLGNING OG EVALUERING

8.1. Resultatopfølgningssystem

Alle de forskellige virkninger af den nye politik (vedrørende enkeltheder henvises til konsekvensvurderingen) må til stadighed gennemgås nøje for at sikre et afbalanceret resultat af gennemførelsen af den nye lovgivning i overensstemmelse med kravene i strategien for bæredygtig udvikling. Det er vigtigt overvåge, hvordan specielt den kemiske industri opfylder de nye krav, og der må sørges for fuldt samarbejde med industrien og navnlig SMV'er med henblik på at fremme forståelsen af, hvordan kravene i REACH anvendes i praksis. Kommissionen vil nøje overvåge industriens konkurrenceevne, dens miljøpræstationer og eventuelle ændringer i beskæftigelsen.

Tilsvarende bliver det nødvendigt med løbende tæt konsultation med andre involverede parter som private miljøorganisationer og forbrugerrepræsentanter, som vil kræve, at Kommissionen sikrer, at REACH gennemføres effektivt og får den forventede gavnlige indvirkning på sundhed og miljø.

For at fremme den evidensbaserede vurdering af effektiviteten af den nye lovgivning og kemikalieagenturet vil der blive etableret et system, der overvåger produktion og resultater såvel som produktionsomkostninger (i fortsættelse af punkt 5.1.1). Overvågningssystemet, der vil blive udviklet af et styringsudvalg med deltagelse fra GD Erhvervspolitik, Miljø og embedsmænd fra FFC i mellemperioden, vil være funktionsdygtigt straks efter lovgivningens ikrafttræden.

Alt efter de indikatorer, der skal overvåges, vil opgaven i begyndelsen enten påhvile agenturet[17], Kommissionen eller medlemsstaterne.[18].

8.2. Hvordan og hvor ofte skal der evalueres?

Med henblik på at vurdere den nye politiks gennemførelse og virkning vil de i punkt 5.1.1. angivne indikatorer blive indsamlet og overvåget, hovedsagelig på årlig basis.

I denne forbindelse skal der mindes om (jf. kapitel 5), at den nye politik indgår i Kommissionens bredere strategi for bæredygtig udvikling. Dens overordnede målsætning er således at tage hensyn til bæredygtig udvikling ved at sikre dels en høj grad af beskyttelse af menneskers sundhed og af miljøet, dels industriens konkurrenceevne i rammerne af det indre marked.

Blandt de vigtigste emner der bør tages op i denne forbindelse, er således, hvordan REACH vil bidrage til opfyldelse af målsætningen for tiltag 04 "Bedre funktion af det indre marked". En indikator for graden af harmonisering på kemikalieområdet er integrationsniveauet af det indre marked for kemikalier. Et mål herfor er hvor mange nationale foranstaltninger, der er indført eller begæret på dette område, og antallet af interne handelskonflikter, som skulle blive færre. Dette vil blive behandlet indgående ved den årlige overvågningsproces og evalueringen af REACH.

Derudover fastslås følgende i forordningens artikel 144 (Indberetning)

---

17 Sædvanlige indikatorer vedrørende drift og økonomi vil blive overvåget og indberettet af agenturet

18 Kommissionen vil være ansvarlig for evaluering af indikatorer vedrørende vurdering af virkning, og medlemsstaterne udarbejder deres egne beretninger som angivet i punkt 8.2.

Hvert tiende år forelægger medlemsstaterne for Kommissionen en beretning om funktionen af denne forordning på deres respektive områder, herunder afsnittene om evaluering og håndhævelse, i det i artikel 108 fastlagte format. Den første beretning afgives dog fem år efter ikrafttrædelsen af denne forordning.

Hvert tiende år forelægger agenturet for Kommissionen en beretning om funktionen af denne forordning. Den første beretning afgives dog fem år efter datoen for den anmeldelse, der kræves i artikel 130, stk. 2.

Hvert tiende år offentliggør Kommisionen en almindelig beretning om erfaringerne med denne forordnings funktion, herunder de i stk. 1 og 2 omhandlede oplysninger. Den første beretning offentliggøres dog seks år efter den anmeldelse, der kræves i artikel 130, stk. 2.

9. FORHOLDSREGLER MOD SVIG

Til bekæmpelse af svig, korruption og andre lovstridige aktiviteter finder bestemmelserne i forordning (EF) 1037/1999 uden begrænsninger anvendelse på agenturet.

Agenturet efterkommer den interinstitutionelle aftale af 25. maj 1999 om interne undersøgelser, udført af OLAF og fastsætter straks passende bestemmelser, der finder anvendelse på hele dets personale.

I aftaler vedrørende finansiering og de deraf resulterende gennemførelsesaftaler og instrumenter skal det udtrykkelig angives, at revisionsretten og OLAF om nødvendigt kan foretage kontrol på stedet af modtagerne af agenturets midler og af de medarbejdere, der er ansvarlige for deres tildeling.

BILAG 1 - Forpligtelsesbevillinger

Finansieringsmodel for det nye kemikalieagentur, specificeret efter aktivitet													
Udgiftspost, alle beløb i 1000 €:	**År 1**	**År 2**	**År 3**	**År 4**	**År 5**	**År 6**	**År 7**	**År 8**	**År 9**	**År 10**	**År 11**	**I alt**	**i %**
Agenturets organer													
Bestyrelse	146	232	232	232	232	232	232	232	232	232	232	2.467	0,7%
Rapportører	0	0	2.300	2.950	3.400	3.850	4.050	4.050	4.050	4.050	4.050	32.750	9,1%
Medlemsstatsudvalg	50	50	425	575	475	450	525	525	450	425	900	4.850	1,3%
Forum	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	2.200	0,6%
Appeludvalg	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	2.200	0,6%
Udgifter til agenturets organer, i alt	*596*	*682*	*4.447*	*5.587*	*6.097*	*6.752*	*7.137*	*7.137*	*7.062*	*7.037*	*7.512*	*60.047*	*16,7%*
Personaleudgifter i forbindelse med REACH-relaterede opgaver													
Registrering	196	913	2.980	931	4.362	2.752	1.183	1.188	1.210	1.347	13.761	30.823	8,6%
Vurdering (*evaluation*)	265	553	934	1.237	982	992	1.108	1.121	979	925	1.985	11.082	3,1%
Vurdering (*assessment*)	393	785	1.696	1.707	1.717	1.727	1.727	1.727	1.727	1.727	1.727	16.661	4,6%
Godkendelse	179	359	526	796	973	1.150	1.243	1.243	1.243	1.243	1.243	10.197	2,8%
Udvalg	62	124	1.608	2.055	2.290	2.526	2.736	2.736	2.736	2.736	2.736	22.347	6,2%
Produkt- og procesorienteret forskning og udvikling	473	946	946	946	946	946	946	946	946	946	946	9.935	2,8%
Vurderingsafgørelser	144	289	289	289	289	289	289	289	289	289	289	3.033	0,8%
REACH-relateret it	400	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	8.404	2,3%
Andre opgaver	510	1.072	2.140	2.036	2.390	2.272	2.157	2.159	2.147	2.155	3.503	22.541	6,3%
Personaleudgiftger i forbindelse med REACH-relaterede opgaver, i alt	*2.622*	*5.841*	*11.920*	*10.797*	*14.749*	*13.454*	*12.190*	*12.209*	*12.078*	*12.170*	*26.991*	*135.022*	*37,6%*
REACH-relaterede støtteopgaver													
Helpdesk, videnskabelig og teknisk rådgivning	711	1.222	1.988	2.070	2.070	2.070	2.070	2.070	2.070	2.070	2.070	20.483	5,7%
Støtte til agenturets organer	441	882	882	882	882	882	882	882	882	882	882	9.263	2,6%
Udgifter til REACH-relaterede støtteopgaver, i alt	*1.152*	*2.105*	*2.870*	*2.952*	*2.952*	*2.952*	*2.952*	*2.952*	*2.952*	*2.952*	*2.952*	*29.747*	*8,3%*
Generelle udgifter													

Menneskelige ressourcer, juridisk og finansiel bistand	1.294	2.679	4.248	3.550	4.084	3.508	3.449	3.592	3.588	3.603	5.653	39.249	10,9%
Publikation og dokumentation	1.323	1.946	3.110	4.110	4.110	4.110	4.110	4.110	4.110	4.110	4.110	39.260	10,9%
Møder og rejser	656	749	997	1.015	1.098	1.068	1.061	1.061	1.057	1.057	1.278	11.097	3,1%
It	1.367	465	777	498	1.222	440	437	498	1.100	503	1.149	8.454	2,4%
Husleje, infrastruktur og vedligeholdelse	2.786	1.553	1.787	1.507	1.680	2.176	1.447	1.508	1.508	2.313	2.779	21.045	5,9%
Generelle udgifter, i alt	*7.426*	*7.391*	*10.920*	*10.680*	*12.194*	*11.302*	*10.504*	*10.770*	*11.363*	*11.586*	*14.968*	***119.105***	***33,1%***
I ALT	*11.797*	*16.019*	*30.157*	*30.017*	*35.993*	*34.461*	*32.784*	*33.068*	*33.455*	*33.745*	*52.423*	*343.921*	*95,7%*
Vurderingsgebyr til kompetente myndigheder	168	235	1.144		1.306	1.297	1.622	1.653	1.299	1.163	3.629	15.461	4,3%
Agenturets budget, i alt	***11.964***	***16.254***	***31.301***	***31.963***	***37.299***	***35.758***	***34.406***	***34.722***	***34.755***	***34.907***	***56.053***	***359.381***	***100,0%***
Dækket af agenturets gebyrindtægt	267	1.192	91.617	5.414	7.922	81.945	6.778	7.730	6.570	15.026	60.665	285.127	79,3%
Rådighedsbeløb fra tidligere år				60.316	33.768	4.390	50.577	22.949	0	0	0		
Dækket over fællesskabsbudgettet	***11.697***	***15.062***	***0***	***0***	***0***	***0***	***0***	***4.042***	***28.185***	***19.881***	***0***	***78.867***	***21,9%***
Overskud af gebyrindtægt til anvendelse over de efterfølgende år			60.316	33.768	4.390	50.577	22.949				4.613		

BILAG 2

FORELØBIGT BUDGET FOR DET NYE KEMIKALIEAGENTUR OPDELT EFTER AFSNIT

Forpligtelsesbevillinger (i tusinde euro)

	Budget år 1	Budget år 2	Budget år 3	Budget år 4	Budget år 5	Budget år 6	Budget år 7	Budget år 8	Budget år 9	Budget år 10	Budget år 11	Budg i alt
Udgifter												
Afsnit 1												
- Lønninger og tillæg	**4 618 ***	**10 429**	**17 721**	**16 681**	**20 633**	**19 338**	**18 073**	**18 093**	**17 961**	**18 053**	**32 874**	**194**
- Andre personaleudgifter	**542 ***	**580**	**1 347**	**649**	**1 183**	**607**	**548**	**691**	**687**	**702**	**2 752**	**1**
I alt afsnit 1	**5 161**	**11 008**	**19 069**	**17 330**	**21 816**	**19 945**	**18 621**	**18 784**	**18 649**	**18 755**	**35 626**	**204**

* For at tage hensyn til, at rekrutteringen af personale i 2006 (budget år 1) er fordelt over hele det første år efter etableringen af agenturet, anslås lønninger og andre personaleudgifter til
af de normale årlige udgifter (det udbetales gennemsnitligt lønninger m.m. i 6 måneder af året).

Afsnit 2												
- Infrastruktur	**2 886**	**1 653**	**1 887**	**1 607**	**1 780**	**2 276**	**1 547**	**1 608**	**1 608**	**2 413**	**2 879**	**22**
- EDB og telekommunikation	**1 684**	**700**	**929**	**650**	**1 374**	**592**	**589**	**650**	**1 252**	**655**	**1 301**	**1**
I alt afsnit 2	**4 570**	**2 352**	**2 816**	**2 257**	**3 154**	**2 869**	**2 136**	**2 258**	**2 860**	**3 068**	**4 180**	**32**
Afsnit 3												
- Møder	**1 166**	**1 259**	**2 972**	**3 480**	**3 623**	**3 798**	**3 976**	**3 976**	**3 897**	**3 872**	**4 568**	**3**
- Rapportører	**0**	**0**	**2 300**	**2 950**	**3 400**	**3 850**	**4 050**	**4 050**	**4 050**	**4 050**	**4 050**	**32**
- Oversættelse	**500**	**1 000**	**2 000**	**3 000**	**3 000**	**3 000**	**3 000**	**3 000**	**3 000**	**3 000**	**3 000**	**27**
- Publikationer	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**2**
- Høringer	**200**	**200**	**800**	**800**	**800**	**800**	**800**	**800**	**800**	**800**	**800**	**7**
- Honorar for vurderinger til MS	**168**	**235**	**1 144**	**1 946**	**1 306**	**1 297**	**1 622**	**1 653**	**1 299**	**1 163**	**3 629**	**15**
I alt afsnit 3	**2 234**	**2 893**	**9 416**	**12 376**	**12 329**	**12 945**	**13 648**	**13 680**	**13 246**	**13 084**	**16 247**	**122**

I ALT	**11 964**	**16 254**	**31 301**	**31 963**	**37 299**	**35 758**	**34 406**	**34 722**	**34 755**	**34 907**	**56 053**	**359**

INDTÆGTER												
- Tilskud fra Fællesskabet	**11 697**	**15 062**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**4 042**	**28 185**	**19 881**	**0**	**78**
- Agenturets indtægter i form af gebyrer	**267**	**1 192**	**91 617**	**5 414**	**7 922**	**81 945**	**6 778**	**7 730**	**6 570**	**15 026**	**60 665**	**285**
- Indtægter overført til næste år	**0**	**0**	**-60 316**	**26 549**	**29 377**	**-46 187**	**27 628**	**22 949**	**0**	**0**	**-4 613**	**-4**
I ALT	**11 964**	**16 254**	**31 301**	**31 963**	**37 299**	**35 758**	**34 406**	**34 722**	**34 755**	**34 907**	**56 053**	**359**

BILAG 3

Anvendt metode og de vigtigste antagelser, som ligger til grund for den finansielle model for det nye kemikalieagentur

Personaleudgifter anvendt som beregningsgrundlag (gennemsnit pr. år):

Lønklasse A (1-4) 172 087 EUR

Lønklasse A (5-8) 103 126 EUR

Lønklasse B 82 609 EUR

Lønklasse C 60 604 EUR

Agenturets organer samt støttefunktioner:

Udgifterne vedrørende bestyrelsen omfatter blandt andet udgifterne vedrørende den administrerende direktør og en assistent i lønklasse A.

Hvad angår alle agenturets organer, er rejseudgifterne blevet beregnet på grundlag af det forventede antal møder. Antallet af møder er enten blevet anslået på grundlag af erfaringerne fra lignende agenturer (f.eks. en forventning om at bestyrelsen mødes 4 gange om året) eller det forventede antal sager et givent organ, skal behandle (dette vedrører f.eks. udvalgene).

Antallet af møder er blevet ganget med antallet af medlemmer af det pågældende organ og med de gennemsnitlige rejse- og opholdsudgifter (baseret på erfaringerne fra Det Europæiske Kemikaliekontor i Ispra).

Derudover er der blevet medregnet personaleudgifter for nogle af de organer, som får et sekretariat (forummet og appelinstansen).

Hvis der er tale om udvalg, er de honorarer, som vil blive udbetalt til rapportøren med ansvar for en given sag, også medregnet.

Personaleudgifter i forbindelse med arbejdet under REACH-systemet:

Da Det Europæiske Kemikaliekontor arbejder under den nuværende kemikalielovgivning, har man mange erfaringer med at fastslå, hvor lang tid bestemte opgaver tager, og hvilke kvalifikationer gennemførelsen af disse forudsætter (differentiering mellem lønklasse A, B og C).

På grundlag af disse erfaringer har Det Europæiske Kemikaliekontor udviklet en personalemodel til brug i forbindelse med arbejdet under REACH-systemet. Personalemodellen kan vise, hvor mange ansatte (opdelt efter lønklasse) der kræves et givent år for at udføre agenturets opgaver.

Det resultat, man når frem til ved at anvende personalemodellen, er blevet ganget med ovennævnte gennemsnitlige udgifter pr. lønklasse med henblik på at udregne udgifterne til driften af systemet.

Bemærk venligst, at udsvingene med hensyn til behovet for personale skyldes ændringer af arbejdsbyrden set over den pågældende periode. Agenturets arbejdsbyrde hænger direkte sammen med antallet af sager, som industrien indsender. Da der findes pålidelige vurderinger af det samlede antal sager, som vil blive indsendt i løbet af de 11 år, er det samlede antal blevet opdelt på grundlag af de frister, som fremgår af lovteksten. Det Europæiske Kemikaliekontors erfaringer har vist, at det er realistisk at forvente, at industrien vil indsende det største antal sager kort før en frist udløber. Det forklarer, hvorfor der er en række år med en usædvanlig stor belastning (navnlig år 11, som i henhold til lovgivningen er den frist, som industrien har til at indsende sager vedrørende stoffer, som fremstilles i mængder på 1-10 ton; disse stoffer forventes at tegne sig for 66 % af alle sager (ca. 20 000)).

Støttefunktioner, som direkte vedrører REACH:

Disse udgifter omfatter uddannelse af medlemsstaternes myndigheder, en helpdesk for industrien og personale, som kan give medlemsstaterne teknisk og videnskabelig rådgivning. Derudover forventes det, at ad hoc-undersøgelser, som skal gennemføres af agenturet i forbindelse med REACH-systemet, vil medføre udgifter af et vist omfang.

Administrative udgifter:

Disse udgifter er hovedsageligt udgifter til personale, som varetager administrationsfunktioner. Det nødvendige antal ansatte er blevet fastsat på grundlag af en gennemførlighedsundersøgelse gennemført af Deloitte & Touche for agenturet og sammenligninger med andre agenturer. Derudover har man taget hensyn til den seneste lovgivning vedrørende reguleringsorganer og på det grundlag afgjort behovet for personale (f.eks. revisionsfunktionen).

Overslaget vedrørende publikations- og dokumentationsudgifter omfatter bl.a. de anslåede udgifter til oversættelse, som vil være af en betragtelig størrelse, da agenturet skal arbejde på alle 20 officielle sprog inden for visse områder under REACH-systemet.

BILAG 4

OVERSIGT OVER VEDTÆGTSMÆSSIGT PERSONALE

EU 25 (baseret på version 19 af den finansielle model)

Kategorier opdelt efter lønklasse pr. år	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
	Tjenestemandsansat personale										
A (1-4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A (5-8)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
I alt lønklasse A	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
I alt lønklasse B	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
I alt lønklasse C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I alt lønklasse D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tjeneste-mandsansat personale i alt	**14**	**14**	**14**	**14**	**14**	**14**	**14**	**14**	**14**	**14**	**14**
	Ikke-tjenestemandsansat personale										
A (1-4)	6	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8
A (5-8)	35	38	64	70	72	74	74	74	73	73	96

I alt lønklasse A	41	44	72	78	80	82	82	82	81	81	104
I alt lønklasse B	19	24	43	43	60	51	49	49	48	48	81
I alt lønklasse C	21	29	82	51	87	75	57	57	56	60	221
I alt lønklasse D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ikke-tjeneste-mandsansat personale i alt	81	97	189	172	227	208	188	188	185	187	406
Personale i alt	**95**	**111**	**203**	**186**	**241**	**222**	**202**	**202**	**199**	**201**	**420**

Begrundelse:

Af hensyn til kontinuiteten i arbejdet og med henblik på at sikre, at et vist minimum af viden bevares inden for rammerne af kemikalieagenturet, skønnes det nødvendigt, at et begrænset antal stillinger bliver besat af tjenestemandsansat personale, således at der kan skabes en "fælles hukommelse".

For at undgå at den samme person har en bestemt stilling i et ubegrænset antal år, bør det dog fremgå af retningslinjerne for agenturet, at der skal findes et rotationssystem mellem de forskellige afdelinger for det tjenestemandsansatte personale.

Det foreslås derfor, at følgende funktioner varetages af tjenestemandsansat personale:

Lønklasse A (5-8)

1 ansat i lønklasse A pr. område under REACH-systemet (registrering, evaluering, vurdering, godkendelse)

Finansafdelingen (1 ansat)

Personaleafdelingen (1 ansat)

Forummets sekretariat (1 ansat)

Appelinstansens sekretariat (1 ansat)

Lønklasse B:

1 ansat i lønklasse B pr. område under REACH-systemet (registrering, evaluering, vurdering, godkendelse)

Forummets sekretariat (1 ansat)

Appelinstansens sekretariat (1 ansat)